

# SOLUBLE PEPTIDE ANALOGUES CONTAINING BINDING SITES

**Publication number:** JP5507197 (T)

**Publication date:** 1993-10-21

**Inventor(s):**

**Applicant(s):**

**Classification:**

- international: **A61K38/00; A61K39/395; A61P25/00; A61P29/00; A61P37/00; A61P43/00; A61P7/02; C07K14/00; C07K14/705; C07K16/00; C07K16/18; C07K19/00; C12N15/09; C12N5/10; C12P21/02; C12P21/08; C12R1/91; A61K38/00; A61K39/395; A61P25/00; A61P29/00; A61P37/00; A61P43/00; A61P7/00; C07K14/00; C07K14/435; C07K16/00; C07K16/18; C07K19/00; C12N15/09; C12N5/10; C12P21/02; C12P21/08; (IPC1-7): A61K37/02; A61K39/395; C07K15/12; C12N15/13; C12N15/62; C12N15/85; C12N5/10; C12P21/02; C12P21/02; C12P21/08; C12R1/91**

- European: **C07K14/705; C07K16/18**

**Application number:** JP19910509369T 19910425

**Priority number(s):** WO1991US02852 19910425; US19900513299 19900425

**Also published as:**

WO9116437 (A1)

US6458360 (B1)

EP0528926 (A1)

EP0528926 (B1)

CA2081207 (A1)

AU7876691 (A)

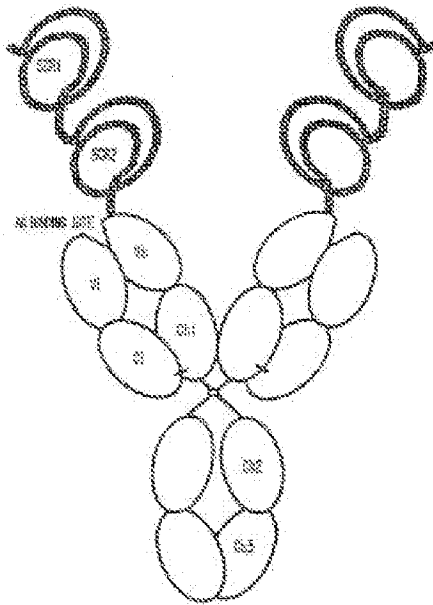
AT168415 (T)

<< less

Abstract not available for JP 5507197 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 9116437 (A1)**

This invention is directed to a soluble recombinant fused protein which is stable in the mammalian circulatory system comprising a polypeptide which contains a recognition site for a target molecule, such as a complement receptor site, and is joined to the N-terminal end of an immunoglobulin chain. The invention is also directed to a construct comprising a plurality of peptides containing short consensus repeats having a complement binding site attached to a soluble, physiologically compatible, macromolecular carrier. The invention is particularly useful for inhibiting complement activation or complement-dependent cellular activation in mammals.



.....  
Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

CR 1

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報 (A)

平5-507197

⑬ 公表 平成5年(1993)10月21日

⑭ Int. Cl.<sup>5</sup> 識別記号 庁内整理番号 審査請求 未請求  
 C 12 P 21/02 ZNA C 8214-4B 予備審査請求 有 部門(区分) 1(1)  
 8931-4B C 12 N 15/00 A  
 7236-4B 5/00 B※  
 (全 18 頁)

⑯ 発明の名称 結合部位を含む可溶性ペプチド類縁体

⑰ 特 願 平3-509369

⑱ 翻訳文提出日 平4(1992)10月26日

⑲ 出 願 平3(1991)4月25日

⑳ 国際出願 PCT/US91/02852

㉑ 国際公開番号 WO91/16437

㉒ 国際公開日 平3(1991)10月31日

優先権主張 ⑳ 1990年4月25日㉓ 米国(US)㉔ 513,299

⑳ 発 明 者 フェアロン, ダグラス・ティー アメリカ合衆国メリーランド州21210, パルティモア, プライスウツド・ロード 3

㉕ 出 願 人 ザ・ジョーンズ・ホプキンス・ユニバーシティ アメリカ合衆国メリーランド州21205, パルティモア, ラツトランド・アベニュー 720

㉖ 代 理 人 弁理士 湯浅 恭三 外6名

㉗ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE, DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), IT(広域特許), JP, KR, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許), US

最終頁に続く

## 請求の範囲

1. 哺乳動物の循環系において安定で、個々の分子に対する認識部位を含む免疫グロブリン鎖のN末端に繋がれたポリペプチドからなる、可溶性組み換え融合タンパク質。

2. 少なくとも1つの鎖が請求項1記載の可溶性組み換え融合タンパク質である抗体分子からなるタンパク質。

3. 上記ポリペプチドが糖体結合部位またはウイルス結合部位の配列に相当する配列を含む、請求項1記載のタンパク質。

4. 上記ポリペプチドが1つまたは複数の短い共通繰り返し配列を含んでいる、請求項1記載のタンパク質。

5. 上記抗体分子が、軽鎖または重鎖の一方がCR1のC4b結合部位を含む認識部位を含み、他方がCR1のC3b結合部位を含む認識部位を含むようなものである、請求項2記載のタンパク質。

6. 上記抗体分子がCR1のC4b結合部位とCR1のC3b結合部位の両方を含む重鎖からなる請求項2記載のタンパク質。

7. CR2の糖体結合部位、CR2のウイルス結合部位、およびSCR1からSCR2までを含むCR2の糖体結合部位からなるグループから選択される認識部位を含む、請求項3記載のタンパク質。

8. CR1の糖体結合部位、SCR3からSCR1-1までを含むCR1の糖体結合部位、C3b結合部位を含むCR1の糖体結合部位、およびC4b結合部位を含むCR1の糖体結合部位からなるグループから選択される糖体結合部位を含む、請求項3記載のタンパク質。

9. リーダーペプチドをコードするDNA配列と免疫グロブリン鎖のN末端をコードするDNA配列との間に、個々の分子に対する認識部位を含むポリペプチドをコードするDNA配列を挿入することにより、免疫グロブリン鎖用の免疫ペプチドをコードすることを含む、請求項1-8記載のタンパク質をコードする発現ベクターの産生法。

10. 請求項1-8記載のタンパク質をコードするDNA配列を含む発現ベクター。

11. 上記タンパク質を発現する請求項10記載のベクターをもつ細胞。

12. 免疫グロブリン鎖のN末端に繋がれたポリペプチド(該ポリペプチドは個々の分子の認識部位を含む)が少なくとも一方の鎖に含まれる抗体分子もしくはフラグメントからなるタンパク質を分泌する、請求項11記載の細胞。

13. 請求項11または12記載の細胞を培養してタンパク質を回収することからなる、該タンパク質の生産方法。

14. 糖体結合部位またはウイルス結合部位を含む認識部位が少なくとも1つ持つペプチドを含み、そして更に生理学的に適合可能な可溶性担体巨大分子を更に含む可溶性構築物(コンストラクト)。

15. 上記ペプチドが短い共通繰り返し配列を含む、請求項14記載の可溶性コンストラクト。

16. 担体巨大分子が免疫グロブリン鎖または抗体分子である、請求項14または15記載の可溶性コンストラクト。

17. 上記ペプチドがCR1の糖体結合部位およびCR2の糖体結合部位を含む、請求項14記載の可溶性コンストラクト。

18. CR2の糖体結合部位、CR2のウイルス結合部位、およびSCR1の初めから終わりまでを含むCR2の糖体結合部位からなるグループから選択される認識部位を含む、請求項14記載の可溶性コンストラクト。

19. CR1の糖体結合部位、SCR3からSCR1-1までを含むCR1の糖体結合部位、C3b結合部位を含むCR1の糖体結合部位、およびC4b結合部位を含むCR1の糖体結合部位からなるグループから選択される糖体結合部位を含む、請求項14記載の可溶性コンストラクト。

20. 請求項1-8記載のタンパク質または請求項14-19記載の可溶性コンストラクトを哺乳動物へ投与することからなる、該哺乳動物における糖体依存性の細胞活性化を阻止する方法。

21. 請求項14-19記載の可溶性コンストラクトまたは請求項1-8記載のタンパク質を、薬液上許容し得るピークル中に含む治療用組成物。

22. 疾病または免疫障害を持った患者に請求項21記載の治療用組成物を投与することによる、該患者の治療方法。

明細書

結合部位を含む可溶性ペプチド断片

本発明は、国立衛生研究所助成金番号A122833及びA128181により提供された援助を受けて成された。合衆国政府は、本発明に対し、一定の権利を有している。

発明の分野

本発明は、細胞分子に対する認識部位を含む、可溶性組織結合タンパク質を目的とするものである。

従来の技術

哺乳類の循環系には、正確な組成成分はそれらの濃度同様に時々変化するものの、多岐にわたる異なる分子が存在している。血清組成のこの変化は刺激のスペクトルに反応したものであり、血清組成及び濃度の変化を感知することによって、哺乳類の様々な器官は刺激に反応することができる。生物体の細胞は、循環系の変化を、血清の様々な組成分子に結合する細胞表面レセプターを用いて認識する。循環系のこれら特定組成成分の、細胞表面レセプターへの結合に影響を及ぼすことで、生物の細胞が刺激へ反応する仕方に変化をもたすことが可能である。

補体システム

環境刺激に反応して変化した、細胞表面レセプターへの結合によってその変化が感知される血清組成成分システムの一つは、補体システムである。補体システムは、例えば微生物のような外来要素を認識するための機構であり、2つの段階を進行する：第一段階は、C3及びC4という二つの補体タンパク質が、補体活性化複合体の一部であるタンパク質及び炭水化物へ共有結合することである。環境刺激に応じて、2つの段階の系路のうちの一つが、C3を切断するC3コンバーターゼ（転化酵素）と呼ばれる酵素を活性化して、C3のアルファポリペプチドよりC3 $\alpha$ -ペプチドを放出させ、C3 $\beta$ 断片に主要な立体構造変化を引き起こす。

第二段階は、リンパ球及び食細胞といった様々な細胞種による、レセプターを媒介とする複合体への結合である。補体による認識の第二段階では、C3及びC

23. 上記タンパク質がC3の補体結合部位またはC3のウイルス結合部位を含む、上記疾病または免疫障害が、不都合なBリンパ球活性化障害、自己抗体/免疫複合体関連障害、エプシュタイン・バーウイルス関連障害、および免疫治療剤に対する不都合な抗体反応が関与する免疫抑制障害からなるグループから選択される、請求項22記載の方法。

24. 上記タンパク質がC3の補体結合部位を含む、上記疾病または免疫障害が、血拴症候群、重症筋無力症、望ましくないまたは不都合な補体活性化が関与する免疫障害、炎症による障害、免疫複合体関連障害、および神経学的障害からなるグループから選択される、請求項22記載の方法。

4の共有結合した断片を含む複合体が、これらの断片に特異的なレセプターを持つ細胞に結合される。これらのレセプターは補体レセプター タイプ1 (CRI, CD35)、タイプ2 (CR2, CD21)、及びタイプ3 (CR3, CD11b/18) と名付けられている。レセプターは、免疫及び炎症反応に関与する様々な細胞種の表面に見出されている。微生物及びその生産物質に対する食細胞及びリンパ球の反応を調節することによって、C3の活性化が経路を通じて起こる場合、この補体システムの認識プログラムが宿主が抵抗するための主要な役割を行う。外来分子に対する抗体により通常の系路が活性化された場合には、補体断片の結合は増幅の役割を担う。

補体レセプター タイプ1のSCRモチーフ

CRIは既に広範にわたって研究されており、ショート コンセンサス リピート (SCR) と名付けられている5070アミノ酸の構造モチーフが発見されている。SCRモチーフは、CRIのF $\alpha$ ロタイプ中では30回タンデムに繰り返されており、他のアロタイプ中ではさらに何回か繰り返される。SCRの共通配列は全てのSCRで不変である4つのシステイン、1つのグリシン及び1つのトリプトファンを含んでいる。他の30個のSCRの半分以上において、更に18残基が同じアミノ酸あるいは他のアミノ酸に保存的に置換されていた形で保存されている (Klickstein, et al., (1987), *J. Exp. Med.*, 165:1095-1112、及び *J. Exp. Med.*, 168: 1699-1717; Hourcade, et al. (1988) *J. Exp. Med.*, 169:1255-1270)。各SCRの大きさはおよそ2.5 $\times$ 3.0nm $\times$ 2nmと見積もられている。

SCR (同じ不変残基を持ち、システイン間の距離が類似しているもの) のタンデムリピートは、補体システムが一つの、さらに12種のタンパク質で同定されている (Ahearn, et al. (1989), *Adv. Immunol.*, 46:133-219)。これらのタンパク質は、C3、C4、またはC5、(すなわち、代替または通常系路のC3-C5コンバーターゼや免疫複合体のサブユニットである相同な補体タンパク質一組) と相互作用する能力をそれぞれ担っている。SCRを含む補体タンパク質は、活性化機能 (C1r, C1s, フクターB及びC2) あるいは他の調節的役割 (フクターH, C4-BP, DAF, MCP, 及びCRI) を持つ

ていたり、食細胞またはリンパ球の機能を引き出すことができる細胞レセプターとして働いたり (CRI及びCR2)、あるいは補体タンパク質型免疫複合体の形成を促進している (C6及びC7) と予想される。従って、SCRは補体システムの最も特徴的な構造の一つである。インターロイキン-2レセプターアルファ鎖、ペーグ-2 $\alpha$ グロブリン (glycoprotein) I及びフクターXIIIのような補体タンパク質以外のものにもSCRが存在していることが、必ずしもこれらのタンパク質が補体に関与する役割を持つことを示すとは限らないが、しかし、その可能性は否定されていない。

CRIのN末端から数えて28番目までのSCRは、4つの一致するグルーブに分けることができ、それぞれ7個のSCRを含む、ロング相同リピート (LHR) と呼ばれ、A, B, C, 及びDで示される。LHR-Dに続いて、残り2つのSCR、そのうしろにCRIを細胞表面にとどめる役割を持つ25アミノ酸の膜貫通領域と43アミノ酸の細胞質領域が置いている。3箇所の補体結合部位はCRI中の以下に位置している：I箇所はC4 $\beta$ に特異的なLHR-A、もう2箇所はC3 $\beta$ に特異的なLHR-B及びLHR-C内 (Klickstein, et al., 1988, 上記)。各LHRのN末端から2つのSCRが、リガンド特異性に因って置いている。補体活性化物質はその表面に複数のC4 $\beta$ 及びC3 $\beta$ 分子を結合すると予測されるため、この多価CRIは、一価のレセプターに比して、それらの分子とより効果的に相互作用することが可能である。

その他の補体レセプター

補体レセプター タイプ2 (CR2, CD21) は、15あるいは16のSCRでできた細胞外領域、24アミノ酸の膜貫通領域及び34アミノ酸の細胞質領域から成る膜貫通型リン酸化タンパク質である (Moore, et al. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:9194-9198; Weiss, et al. (1989), *J. Exp. Med.*, 167:1047-1066, 本明細書の参考文献に含まれる)。可溶性組織結合CR2を電子顕微鏡で研究した結果、CRI同様、CR2は、計算上長さ3.9、5ナノメートル $\times$ 3.2ナノメートルの外縁を持つ、長い、非常に柔軟性に富む分子であり、そのなかにSCRは2、4ナノメートルの長さの小区として見えることが示された (Moore, et al. (1989), *J. Biol. Chem.*, 264:20576-20582)。

CR2はエプスタインバー ウィルス (EBV) の gp350/220エン  
グロップタンパク及び糖タンパクC3d gタンパク断片双方に対するB細胞レセプ  
ターである (Ahearn, et al., 1989, 上記)。抗CR2モノクローナル抗体 (OK  
B7) は、C3d g及びEBV双方の結合を阻害し、天然及びウィルス性のリガ  
ンドがレセプター上の二つの同じあるいは近接の部位に結合することを示唆して  
いる (Nowcrum, et al., (1985), *J. Virol.*, 55:347-351)。CR2の欠失あるいは  
置換変異体を、COS細胞中で発現する真核生物発現ベクターを用いた組換え  
DNA実験によって、CR2のリガンド結合部位が分子のN末端部の二つのSC  
Rに位置付けられた (Lowell, et al., (1989) *J. Exp. Med.*, 170:1931-1946  
)。細胞結合型CR2によりC3b及びC3d gのような多価型C3リガンド  
が結合することが、B細胞の活性化を引き起こす (Nelchers, et al., (1985),  
*Nature*, 317:264-267; Bohnsack, et al., (1988), *J. Immunol.*, 141:2569-  
2576; Cortier, et al., (1988) *J. Immunol.*, 141:457-463及び Cortier, et al.,  
(1989), *J. Immunol.*, 143:1755-1760)。

第三の糖タンパクCR3もまた、C3bを結合する。CR3へのC3b  
の結合が、炎症中に補体活性化された内皮細胞への好中球白血球の付着を促進  
する。CR3もまた血作用に因与し、その作用では、C3bに被われた粒子が、  
好中球白血球あるいはマクロファージに飲み込まれる (Weight, et al., (1982  
) *J. Exp. Med.*, 155:1149; (1983) *J. Exp. Med.*, 158:1338)。

#### 可溶性糖タンパク

CR1は補体活性化を助長するための糖タンパクである。CR1のみが、C  
3b及びC4bの特異性に加えて、両者のC3コンバージョンの解離能力、  
及びファクターIによってC3b及びC4bをタンパク分解して不活化する時の  
共同因子活性を併せ持っている。さらに、恐らく決定的に重要なこととして、  
CR1のこれらの機能が代償系路によって制限されないことが挙げられ、この  
ため非免疫的耐性による活性の抑制に耐えるレセプターとなっている。

可溶性CR1 (sCR1) 断片を、膜貫通及び細胞質領域が欠失したcDNA  
を用いて、組換えDNA技術により作製した (Fearon, et al., 国際特許出願  
WO 89/09220号、1989年10月5日公開、Weisman, et al.,

性質を持たないようである (Nowcrum, et al., (1990) *J. Virol.*, 64:1448-13  
52)。可溶性レセプターは免疫原性とはならないため、効果を上げるためにアジュ  
バントを使用する必要がなく、さらにまた、効能は完全な免疫系があるかどうか  
には依存しないと予想される。

CR2はエプスタインバー ウィルスに対する反応の初期決定因子の一つで  
あるが、それは細胞膜にウィルス粒子を特異的に結合するためである。レセプタ  
ーの細胞外領域は完全に含むが、膜貫通および細胞質領域を持たない発現ベク  
ターより、組換えシステム内で可溶性CR2を作製した。この組換えCR2は、エ  
プスタインバー ウィルスと1:1の割合、Kd=3.2 nMで結合すると報  
告されている (Moore, et al., (1989), *J. Biol. Chem.*, 264:20576-20582)。

ウィルスに対する可溶性型の膜結合型レセプタータンパクを投与することによ  
ってウィルスの結合を阻止するという試みは、他のウィルス系、特にAIDSで  
探索されてきた。AIDSウィルス レセプター タンパクCD4は、細胞外領  
域はコードするが膜貫通及び細胞質領域はコードしないDNAを用いて、組換え  
方法により、可溶性型で作製された (Russey, et al., (1988), *Nature*, 331:7  
8-81)。この組換えタンパクは培養細胞のAIDS感染を阻止することに成功し  
たが、しかし、患者に注射した場合、薬剤除去の大部分の最終の半減期である約  
一時間ほどで、組換えタンパクは急速に取り除かれてしまった (Kabb, et al., (1990),  
*Ann. Intern. Med.*, 112:254-261)。

#### ハイブリッド免疫グロブリンタンパク

可溶性CD4の半減期の短さを克服するために、ネズミの免疫グロブリン分子  
の可変領域をコードするDNAをCD4の結合領域をコードするDNAに置き換  
えた組換えDNA技術により、ハイブリッド分子を作製した (Capon, et al., (1989),  
*Nature*, 337:525-531及び国際特許WO 89/09222)。このことは、  
CD4がそれ自体免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーの一員であり、従  
って、置換された可変領域に類似した構造を持っているために可能である。ネズ  
ミ免疫グロブリンを骨格とするCD4ハイブリッドは、可溶性CD4と比較して、  
ウサギにおいて血清中の半減期がかなりの増加を示した。

(*Clin. Res.*, 38:287A, 1990)。Fearonらが1988に記載したベクターpBSCR  
1cから生産して精製したsCR1タンパク (以後、本明細書ではsCR1/p  
BSCR1cと呼ぶ) は、二量体<sup>133</sup> I-C3b及び<sup>133</sup> I-C4bにKd:(  
平衡解離定数) 1 nM及び12 nMで結合し、ファクターIによるこれらのタンパ  
ク質の切断を媒介し、さらにナノモルの濃度でヒト血清中の通常及び代償系路を  
阻害したことから、リガンド結合部位は完全であり、強力な試験管内阻害剤を  
持つことが示された (Weisman, et al., 1990, 上記)。

sCR1/pBSCR1cの生体内での補体阻害機能をラットモデルに研究  
した (Weisman, et al., 1990, 上記)。sCR1/pBSCR1cは、補体活性  
化を阻害し、局所貧血によって損傷した心筋内での好中球白血球の蓄積の減少に  
より実証されたように、炎症を低下し、さらに組織の損傷を小さくした。組換え  
sCR1/pBSCR1cは、局所貧血に引き続く炎症において、組織の受ける  
損傷を弱める。従って、免疫複合体による<sup>133</sup> 肺炎、糸球体腎炎、溶血性貧血、重  
度の類風湿症、奇形性関節炎及び多発性硬化症のような、補体依存性があるとわ  
かっている、より複雑な自己免疫疾患に対する処置への適用にとって好ましいも  
のである。

可溶性CR2類似体の作製が試みられた (Moore, et al., (1989), *J. Biol. C  
hem.*, 264:20576-20582)。可溶性CR1のシステムに倣って、レセプターの細  
胞外領域は完全に含むが、膜貫通および細胞質領域を持たない発現ベクターより、  
組換えシステム内で可溶性CR2を作製した。この組換えCR2はC3d gと  
1:1の割合、Kd27.5 nMで結合した。しかしながら、C3d gに  
対する結合親和性が低すぎるため、いかなる治療への応用も到底不可能である。

#### 抗ウィルス薬剤としての可溶性レセプター

急性のウィルス感染を阻止するために可溶性のウィルスレセプターを用いるこ  
とには、数多くの利点がある。様々なウィルス感染体も同一の細胞レセプターを  
認識しなければならないため、ウィルスのエンベロープタンパクあるいは糖  
の置換によって生じる抗原の低下や多型という問題を回避できると予想される。さ  
らに、細胞レセプターのウィルス結合領域は、抗原性、毒性または免疫抑制的な

Bruggemannら (1987, *J. Exp. Med.*, 168:1351-1360) もまたハイブリッド抗  
体を作製して、抗原結合部位を不変の状態で備えている抗体の機能に対して、分  
子の様々な部分における変化が及ぼす影響を研究した。この研究でもまた、免疫  
グロブリン分子に挿入したペプチド配列は、それによって置換されたペプチドの  
ものと類似していた。この研究によって、免疫グロブリン構造の領域は、分子全  
体の構造を損なわずに、類似した構造によって置換できることが示された。

生化学的研究に用いるのに十分なT細胞レセプタータンパクを得るために、Ge  
scowge らは (1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:2838-2840) T細胞レ  
セプターと免疫グロブリンのハイブリッドタンパクをコードする発現ベクターを  
構築した。T細胞レセプターは免疫グロブリンスーパーファミリーの一員であり  
、レセプタータンパクを系統的にコードする配列を形づくるように再構成する。  
いくつかの類似の遺伝子部分からなるゲノムDNAにコードされている。最終的  
に再構成された配列は、免疫グロブリン同様に、可変、多様及び連結領域を持つ  
。ハイブリッドレセプタータンパクは、免疫グロブリン重鎖の発現ベクターの可  
変領域をT細胞レセプターの再構成可変領域で置換して構築された。そして、こ  
のベクターを、軽鎖のみを分注している細胞系で発現させた。形質転換した細胞  
系は、免疫グロブリンとT細胞レセプター双方の決定因子を持つキメラタンパク  
を分泌した。

上記の先の技術では、免疫グロブリンスーパーファミリー (Rod, et al., (19  
85), *Cell*, 40:225-229) 由来の免疫グロブリンペプチドとの相同性を持った、  
類似のユニットを有するペプチド領域をコードするDNA配列のみで置換した。  
免疫グロブリン鎖の相同ユニットに対応するDNA配列は、宿主細胞のハイブリ  
ッドタンパクを発現する能力を損なうことなく、除去、及び免疫グロブリンス  
ーパーファミリーに属する他のタンパク質由来の、類似相同ユニットをコードする  
DNAにより置換された。

#### 発明の概要

本発明の一つの目的は、恒久的分子に特異的に結合可能な可溶性タンパク質で、  
哺乳類細胞系からの除去半減期が長いタンパク質を提供することである。

本発明のもう一つの目的は、恒久的分子に特異的に結合可能な可溶性タンパク質

で、他の分子に対してより高い親和性を持つタンパク質を提供することである。

本発明のさらなる目的は、補体タンパクに対して特異的に多価に結合することのできる可溶性の構築物を提供することである。

本発明のまたもう一つの目的は、血管内から組織へよりよく拡散するであろう小型の構造を持つ可溶性の構築物を提供することである。

本発明のさらにもう一つの目的は、細胞間結合型のレセプターと結合し、哺乳類の循環系に保持されると予想される可溶性の構築物を提供することである。

本発明のさらなる目的は、循環系に安定に存在する可溶性の構築物を投与して、動物内の補体によって起こる細胞活性化を阻害する方法を提供することである。

本発明のさらにもう一つの目的は、循環系に安定に存在する可溶性の構築物を投与することによって、動物内の補体活性化を阻害する方法を提供することである。その一面として、本発明は、哺乳類の循環系内で安定であり、他の分子認識部位を含みかつ免疫グロブリン鎖のN末端の隣に連結されたポリペプチドから成る、可溶性組換え融合タンパク質について考える。治療にその組換え融合タンパク質を使用することにもまた意図されている。

関連した一面として、本発明は、免疫ペプチド、並びに、リーダーペプチドをコードするDNA配列と免疫グロブリン鎖のN末端の隣をコードするDNA配列の間に、結合あるいは認識部位をコードするDNA配列を導入することによって、免疫グロブリン鎖の免疫ペプチドを改変することからなる組換え融合タンパク質免疫ペプチドの作製方法について考える。ペプチドを含む宿主細胞についても、免疫グロブリン補綴を好ましく発現するような細胞を考慮して、少なくとも一つの免疫グロブリン鎖のN末端に、融合した結合あるいは認識部位を持つ、完全な免疫グロブリン分子あるいはフラグメントが分泌されるようにする。

本発明のこの面の組換え融合タンパク質は、免疫グロブリン分子の安定性及び可溶性によって、可溶性で、水性の培養液、特に哺乳類循環系で比較的安定であると予想される。組換え融合タンパク質が抗体分子の一部として分泌される場合、抗体分子は、4個の免疫グロブリン鎖のうちの少なくとも2個のN末端の隣に付いたポリペプチド認識部分を持ち、さらにまた、多価性を与える他の分子に対し

てより高い親和性を示す。免疫グロブリン構造に由来する柔軟さ、特に抗体分子のヒンジ(つがい)によるものであるが、これが、ポリペプチド結合部位の動きが、そのほかの部分に比べて、他の分子上の相補部位の三次元配置への結合部位の三次元的配置の適応を容易にすることを可能にしている。

一方、補体結合部位をもつ多数のショート コンセンサス リピートを含む組換え融合免疫グロブリンタンパクの利用は、本発明の好ましい態様であるが、本発明はまた、より広範囲に、可溶性で生化学的に適合可能な宿主に連結した補体結合部位を持つショート コンセンサス リピートを含む複数のペプチドから成る構築物や、このような構築物の治療への利用についても考慮する。

このような構築物は、複数の結合部位を呈示すること(多価)によって結合の親和性を高めることで、重要な利点を提供する。本発明の構築物が示す高い親和性は、この構築物を治療に利用する上で、重要な利点を提供する。成態CR2は低親和性の結合部位を一つしか含まないため、このような利点は、特にCR2由来のショート リピードを用いる治療にとって重要である。

#### 図面の簡単な説明

第1図、CR2-IgG1融合タンパク質発現に構築されたプラスミドの地図。CR2:補体レセプター タイプ2; VH:可変領域; ガンマ1:不変領域; CH1-3:不変領域コード領域; NEO:G418耐性コード遺伝子; SV40:強ウイルス40アロモーター。

第2図、CR2-IgG1用プラスミド構築時の、ガンマ1ゲノムDNAに導入したDNA配列の改変の詳図。

第3図、完全なCR2-IgG1の概念モデル。SCR1, 2:CR2分子のショート コンセンサス リピート; VH, CH1, h2, h3:重鎖の可変及び不変領域; V1, C1:ラムダ軽鎖の可変及び不変領域。

第4図、<sup>125</sup>I-標識pCR2-IgG1のK562細胞上のCR2への結合のCR2-IgG1による阻害。

第5図、30倍希釈モル濃度の非標識融合物質存在下または非存在下における、<sup>125</sup>I-標識pCR2-IgG1のB95/8細胞への結合。

第6図、CR2-IgG1による末梢血Bリンパ球のB220染色の阻害。

第7図、マウスをCR2-IgG1で処理した場合のフルオレセイン特異的IgMレベルの低下。

第8図、CR2-IgG1による、フルオレセイン-フィコールによって生じた、フルオレセイン特異的ブラーク形成細胞数の減少。

第9図、pSNRCR2及びpSNR021<sup>+</sup>プラスミドをそれぞれ安定に発現するJ558L細胞から分泌された、精製組換えCR2-IgG1(左列)及びIgG1(右列)のSDS-ポリアクリルアミドゲル。

第10図、ヒトまたはネズミのC3断片を扱うチモサン粒子に対する<sup>125</sup>I-pCR2-IgG1の結合。(A)Ca<sup>2+</sup>及びMg<sup>2+</sup>が存在して代謝系活性が低い条件下(白四角)、あるいはEDTAを加えてその活性化を阻害した条件下(黒四角)で、ヒト血清と反応させておいた1.3x10<sup>6</sup>のチモサン粒子に<sup>125</sup>I-pCR2-IgG1を段階的に増加した様々な濃度で加えて、30分、0分でインキュベートした。10%BSAに通して粒子を洗心して結合したリガンドと解離しているリガンドを分離した。粒子に付着したC3断片に対する<sup>125</sup>I-pCR2-IgG1の特異的結合(白丸)は、それぞれ、陽イオン存在あるいは非存在下の血清と反応させておいた粒子への結合量の差として算出した。日付は二重測定したという意味を示している。(B)<sup>125</sup>I-pCR2-IgG1の、二価陽イオン存在下(白四角)またはEDTA存在下(黒四角)で、ネズミ血清と反応させておいたチモサン粒子に対する結合量も同様に調べ、特異的結合(白丸)を(A)で述べた実験と同様に算出した。

第11図、ヒツジ赤血球(E)で免疫したマウスにおける、CR2-IgG1とコブラ毒因子(CVF)の免疫抑制効果の比較。5から8週齢のBALB/cマウス8匹を含む1グループから、4x10<sup>5</sup>または4x10<sup>6</sup>のヒツジEで静脈内免疫する24時間前以内にCVF(ドイツ、ゲッティンゲンのO. Gotzel博士より供与していただいた)5ミクログラムを4回投与する処置によってC3を除去した。2グループのマウスには、総量800ミクログラムのCR2-IgG1またはIgG1を、4回に等分して、免疫後24時間以内に、静脈注射して投与した。4番目のグループのマウスにはPBSのみを投与し、免疫を行わなかった。5日目に、脾臓の抗ヒツジEブラーク形成細胞数をアッセイし、さらに5個

の同型での特異的抗ヒツジE抗体の血清濃度をELISAで測定した。データは、各決定に用いられたマウス4匹の平均値±標準偏差(SEM)で示す。

第12図、BALB/c及びC3H/HeJマウスにおけるヒツジEに対する抗体反応のCR2-IgG1による抑制の経路。BALB/c及びC3H/HeJマウス5匹からなる2つのグループに、それぞれ、総量800ミクログラムのCR2-IgG1(黒四角)またはIgG1(白四角)を、分割して、4x10<sup>6</sup>のヒツジEで免疫する直前、免疫中及び免疫後17時間以内に投与した。3番目のグループのマウスにはPBSのみを投与し、免疫を行わなかった(白丸)。5日ごとに、特異的抗体濃度をELISAで測定した。データは、反応の最も高い個体と低い個体を除いて残ったマウス4匹の結果の平均値±標準偏差(SEM)で示す。

第13図、<sup>125</sup>I-標識組換えIgG1、CR2-IgG1、及びCR2-(Fab')<sub>2</sub>のマウス血しょう内における半減期。

第14図、sCR1/pBSCR1c、及びSCR-8から11が免疫グロブリン重鎖に連結しているCR2-(Fab')<sub>2</sub>による、<sup>125</sup>I-C3b-2重体のヒトEに対する結合の阻害。

第15図、sCR1/pBSCR1c及びCR2-(Fab')<sub>2</sub>による、抗体に感知されるヒツジEのヒト血清中における溶解の阻害。

第16図、sCR1/pBSCR1c及びCR2-(Fab')<sub>2</sub>による、チモサン処理したヒト血清中におけるC5a-desArgの生産阻害。

第17図、sCR1/pBSCR1c及びCR2-(Fab')<sub>2</sub>による、チモサン処理したヒト血清中におけるC5a-desArgの生産阻害。

図18、CR1-F(ab')<sub>2</sub>、コンストラクトの配列が変えられている。P<sub>5</sub>L1が示されている。SCRの8番目から11番目までを含むCR1のスクレオチド1501から2262までを本ペプチドのP<sub>5</sub>L1部位にクロン化して、IVS-IgG1-リーダー介在配列:スクレオチドは、CR1リーダー-スクレオチド28-150、そしてCR1のN端-スクレオチド151となるように番号をつけてある。

#### 発明の詳細な説明

本発明の一つの様相は、個々の細胞に対する認識部位を持ったポリペプチドが免疫グロブリン鎖のN末端部分に付けられている融合タンパク質を企図している。本融合タンパク質は遺伝子組み換えシステムにおいて産生される。目的とするポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNA配列を免疫グロブリン鎖のための発現ベクター内に挿入し、改変された本発明ベクターの菌が、認識部位に相当するポリペプチドの前に分泌を促すリーダー配列を含むポリペプチド、およびそれから実質的に完全な免疫グロブリン鎖を生じるようにする。この改変された発現ベクターを、他の宿主免疫グロブリン鎖を生産する能力を好適に有する宿主細胞に導入し、本ベクターが感染されると、本宿主細胞が、あるタイプの免疫グロブリン鎖のN末端に接合された認識部位に相当する外来性のペプチド配列を持つ完全な免疫グロブリン分子に相当する分子を分泌するようにする。"免疫グロブリン分子"および"抗体"という用語はF<sub>ab</sub>および(F<sub>ab</sub>)'、などの、完全な抗体タンパク質のフラグメントを含んでいることが理解される。

#### ポリペプチド

本発明のこの様相により企図されるポリペプチドは、疎水性環境において維持される固有の3次元構造をとり、標的分子を認識する部位を含んでいるポリペプチドのいずれも広く包括しており、本ポリペプチドのアミノ末端およびカルボキシ末端は水性溶液に比較的に利用しやすいものである。好適なポリペプチドは、認識部位に不変な領域を除いたり利用しやすいアミノおよびカルボキシ末端を残したりするために任意に切断されるCR1およびCR2などの種々の受容体の認識ドメインに相当するものである。本ポリペプチドの便利な末端により、結合部位の3次元構造を乱すことなく、そのアミノ末端にリーダー配列をついたりカルボキシ末端に免疫グロブリン鎖の残りの部分をついたりすることが可能となる。

本発明の融合タンパク質を作るために付加される認識ポリペプチド部分は免疫グロブリン配列の末端に付加されるので、免疫グロブリンの構造に害与する要素は置換されない。それ故、本来の構造を破壊することにはならない。その結果、特異的な認識能力を持ついかなるポリペプチドも、本ポリペプチドが個々の構造を形成し疎水性溶液中で安定でアミノ末端およびカルボキシ末端が利用しやすいならば、タンパク質に取り込まれる認識領域または結合領域の基本として使

用することができる。

本発明は、認識部位の基本として使われるタンパク質が1個で、その認識部位に結合する標的分子が複数の結合部位を持っている場合に特に適している。1個の結合反応のK<sub>d</sub>が1マイクロモルまたはそれより高い場合、本発明の抗体(本抗体の各鎖の少なくとも1つの鎖は付加された結合部位を含む融合タンパク質である)はより大きな親和性(つまりK<sub>d</sub><1マイクロモル)で結合する多価の結合タンパク質である。例えば、腫瘍坏死因子および細胞質ドメインなしで阻害されたCR2の可溶性はC3dにK<sub>d</sub>=2.7、5マイクロモルで結合する(Moore)ら、1989、上記)が、一方、CR2を基本とした本発明による可溶性融合タンパク質はK<sub>d</sub>=5nMで結合する(実施例2、下記)。

本ポリペプチドが1つまたは複数の複製の構造を形成し、その結果生じる融合されたタンパク質が発現され可溶性であるならば、ポリペプチド自体が複数の結合部位または認識部位を任意に含むことができる。ポリペプチドの大きさは、大きくて動物組織への拡散が過度に制限されるような融合タンパク質を作らない程度であることが好適である。

ポリペプチドの別の好適なグループは、短い繰り返し共通配列(SCR)またはconsensus repeat: その多くは様々な抗体フラグメントの認識に関与している)から成るものである。これらの分子の認識ドメインまたは結合ドメインは、少数のSCRから成る。その配列が隣接したSCRの間に位置する残基で始まりそして終わるポリペプチドを使用すると、その結果得られるポリペプチドは、個々の3次元構造および利用しやすい末端という求める特性を持つであろう。以上のことから、求める結合部位を持つが、認識部位に関与しない他のペプチド配列が実質的に無いポリペプチドを生産することが可能である。短い繰り返し共通配列(SCR)からなるタンパク質のグループは、C1r、C1s、ファクターB、C2、ファクターH、C4BP、DAF、MCP、C6、C7、インターロイキン2受容体アルファ鎖、ベータ2-ミグロブリン1、およびファクターXII同様、補体受容体CR1およびCR2を含む。

本発明のこの様相により企図されるポリペプチドはSCRからなるポリペプチドに限定されるものではない。それらは、求めるエピトープ、CD4、CD19

、T細胞受容体などを含むいかなる種類の受容体、またはC3d認識部位などの、受容体に相補的な分子構造を含むペプチドを含んだ(しかしそれだけに限定されてはいない)異なる3次元ペプチドのいづれであってもよい。

#### 免疫グロブリン鎖

本発明の融合タンパク質は本ペプチドをいづれかの免疫グロブリン鎖に連結させたものであってもよい。インタクトな抗体分子は両鎖系において安定であり、融合タンパク質の長期的な安定性が重要となる場合には、それを融合タンパク質の抗体部分によって供給することもできる。多くの状況において、通常、動物内に存在しないエピトープに特異的な抗体を利用することも求めることができる。本発明は、しかしながら、通常、動物内に存在するエピトープに特異的な抗体を使用することも企図している。その抗体の抗原結合部位の特異性は、融合タンパク質の構築を容易にするために選ばれてもよい。

異なるアイソタイプの免疫グロブリン鎖を使用することもできる。好適なアイソタイプは本組み換え融合タンパク質の最終用途に依存するであろう。ガンマ鎖はFc受容体に結合する可溶性融合タンパク質の産生を指示するものであり、アルファ鎖はIgM型に結合する融合タンパク質の産生を指示するものである。そして、イグロン鎖は肥満細胞に結合する融合タンパク質の産生を指示するものである。ポリペプチド認識配列はN端(免疫グロブリン分子の可変部の一部)についていてもよいので、F<sub>ab</sub>および(F<sub>ab</sub>)'、などの免疫グロブリンフラグメントも、可変部が存在する限りにおいては本発明によって企図される。

F<sub>ab</sub>もしくは(F<sub>ab</sub>)'分子は、産生ヒンジ部の後ろでのタンパク質分解の切断あるいは終止コドンの導入によってFc領域を欠失させることにより産生することができる。本融合タンパク質の最終的な治療用途に依存して、Fc受容体を介した補体活性化複合体の除去を提供するため、本融合タンパク質の免疫グロブリン部分において非補体活性化アイソタイプのFc領域を維持することが好適な場合もある。

#### 発現系

改変された免疫グロブリン発現ベクターは、プロモーター、リーダー配列、および求めるポリペプチド結合領域に相当する配列を組み合わせて、

新たに構築することができる。これらの配列に相当するDNA配列は、核酸合成、ポリメラーゼ連鎖反応、およびゲノムまたはcDNAの分子クローニングを含めた、良く知られた種々の方法によって得ることもできる。プロモーターおよびリーダー配列は、免疫グロブリン鎖を含め、種々のタンパク質を発現させる技術においては非常に有用である。その有用なプロモーターおよびリーダー配列は、本プロモーターが発現を、そしてリーダー配列が発現時に選ばれた宿主系において正しく折り畳まれた組み換えタンパク質の分泌を指示するものであれば、いかなる組み合わせによっても利用することができる。

適当な免疫グロブリン鎖配列も本分野ではよく知られている。免疫グロブリン鎖をコードする配列は、発現を指示するプロモーターと分泌を指示するリーダー配列を含む発現ベクターにおいて好適に提供される。発現のためのエンハンサーも本ベクターに含まれていることが最も好適である。そのような発現ベクターは本分野においては非常に有用である。例えば、一つもしくは複数の免疫グロブリン鎖をコードする発現ベクターの多くはアメリカンタイプカルチャーコレクション、Rockville、メリーランドより入手可能である。

特に好適なベクターはpSNR021と名付けられた、マウスガンマ1ゲノムクローンであり、これは、分泌を指示するネイティブリーダー配列の後ろに免疫グロブリンプロモーターの制御下にある、ハプテン、4-OH-3-エトロフエノアセチル(NP)に特異的なマウスガンマ1重鎖の配列および発現エンハンサーを含んでいる(バラーフ(Ballard)ら、(1986)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:9826-9830、本明細書中では参考文献に取り入れられている)。免疫グロブリン鎖のいづれ一つの発現および分泌を供する他のベクターも本発明において働くものである。発現ベクターの選択は、この2つの事項を両立させなければならないので、改変ベクターの発現に使用される宿主細胞に要し依存するものである。

求めるポリペプチドおよび免疫グロブリン鎖のためのDNA配列を得るための有効な方法が本分野の技巧の内にあることは容易にわかり、免疫グロブリン配列および求める認識部位に相当する配列の両方を含む改変ベクターは、本分野でよく知られたいづれの方法を用いても調製することができる。例えば、ある改変ベ

クターは、免疫グロブリン鎖の5' 端近くの発現ベクターの配列中に制限部位を見出し、その制限部位を挿入部位の構築に利用することによって調製することができる。次に、挿入部位のための配列を本発明ベクター中に挿入する。その挿入部位は、分岐を示すリーダー配列の3' 側になければならない。

求める融合タンパク質の発現を容易にするために、短いオリゴヌクレオチドをセグメントの一端もしくは両端につけることもできる。例えば、制限部位がコドンに一致しない場合は、本ポリペプチドと本免疫グロブリン鎖の両方の読み枠を保持するために、付加的なヌクレオチドを挿入してもよい。改変ベクターの配列はリーダーペプチドの切断シグナルをコードしていなければならない。好適な様式では、免疫グロブリン配列の最初の1-10アミノ酸のコドンは、リーダーペプチドを切断する酵素が切断部位を確実に認識できるよう、挿入した配列の5' 側に保持される。完成した分子の免疫グロブリン部分が正しく折り畳まれるように、これらと同じアミノ酸のコドンを挿入した配列の3' 側に折り返してもよい。

2つの個別な構造の間にブリッジを形成するために、ポリペプチド配列の3' 端と免疫グロブリンをコードする配列の5' 端との間に、付加的なアミノ酸をコードする配列が含まれていてもよい。このようなブリッジは、2つの個別な構造が互いに干渉することなく、発現したタンパク質が正しく折り畳まれるよう、付加的な柔軟性を提供し得る。本ブリッジは、抗体の2つの腕にあるポリペプチド配列の結合領域が個々の分子上の多数の結合部位の3次元の関係に対し空間的に適応するための柔軟性にも寄与することである。

本ブリッジペプチドは、水溶液中でその機能を促進し、哺乳動物の循環系に見出されるプロテアーゼに耐性な、疎水性および親水性アミノ酸の混合物から構成されるべきである。本ブリッジは10またはそれより少ない数のアミノ酸を含むことが好適である。特に好適なブリッジはアミノ酸、バリンおよびセリンから成るジペプチドである。ブリッジは様々な利益をもたらす得るが、正しい読み枠が維持され、融合タンパク質の他の部分によってポリペプチドまたは免疫グロブリンの部分のフォールディングが影響されない限りは、その存在は必要ではない。

別に明かとなるであろう。宿主細胞の宿主細胞を、例えば本免疫グロブリン配列がFc部を含まずそれ故に後のグリコシル化を要しないFabフラグメントに相当する場合には、本融合タンパク質の発現に使用してもよい(ベクター(Belter)ら、(1987)、Science、240:1038-1041を参照)。

組み換え融合タンパク質をコードする配列を含む改変発現ベクターは、エレクトロトランスフェクション、リポフェクションなどの本分野で広く使われている技術のいずれかによって宿主細胞に導入することができる。細胞を増殖させ融合タンパク質を発現させるための条件は、使用される特定の宿主細胞およびプロモーターに特有のもので本分野ではよく知られているものである。改変ベクターを含む相補的な免疫グロブリン鎖を発現する宿主細胞は、正しく折り畳まれ、本鎖の一方のN末端に融合された結合領域を含むポリペプチドをもった抗体分子を分泌することである。宿主細胞がいずれの免疫グロブリン鎖も発現しない場合、2つのタイプの免疫グロブリン鎖(重鎖および軽鎖)に相当し、異なる結合領域をコードするポリペプチド配列を各々が持つ2つの改変ベクターを本細胞に導入することもできる。そのような細胞は、各鎖が2つのN端にそれぞれ付けられた2つの異なるポリペプチド結合領域を持つ抗体分子を分泌するであろう。

本組み換え融合タンパク質は、改変された本宿主細胞を標準的技法を用いて増殖させる発酵または培養プロセスから回収できる。宿主である細胞は濾過などのいずれの簡便な手段によっても除くことができる。本融合タンパク質は、標準的な生化学的分離手段によって回収できる。特に有用な方法はアフィニティクロマトグラフィーである。本組み換え融合タンパク質は多くの独特な認識部位を有している。元の免疫グロブリンの抗原結合部位、N端に挿入された認識部位、およびFc部位などの免疫グロブリン分子に特異的な他の部位である。これらのいくつかと相補的なものを含むアフィニティクロマトグラフィー系は普通の研究者によく知られた技法によって本融合タンパク質を精製するのに利用することができる(Methods in Enzymology, Volume 34, ジャコビ(Jakoby)ら編、Academic Press, N. Y., 1974)。好適な様式においては、選択されたベクターは4-ヒドロキシ、3-ニト

本ポリペプチドをコードするDNA配列を本ベクターに挿入し、本組み換え融合タンパク質が発現されたときに、ポリペプチドが免疫グロブリン鎖のN末端についているようにする。最も好適な場合は、本ポリペプチドがブリッジの有無に拘らず免疫グロブリン配列の最初のアミノ酸に融合されているものである。より広く言えば、免疫グロブリン鎖の3次元構造が発現の際に壊れなければ、本ポリペプチドはN端のいずれのアミノ酸に融合されてもよい。

#### 組み換え融合タンパク質の精製

本改変発現ベクターを発現させるための細胞配列の選択は重大ではない。一般的に、正しく折り畳まれた免疫グロブリン分子を発現し、in vivoで起こるいずれの翻訳後修飾も完了させることから、哺乳動物の細胞系が使用されるだろう。本発明のベクターを発現させることのできる細胞系は容易に入手できる(例、アメリカンタイプカルチャーコレクション参照)。好適な細胞系は、本発明の改変発現ベクターにコードされる鎖に相補的な鎖を分泌するミエロマである。そのような細胞を産生する方法はシュネー(Schnee)ら、(1987)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84:6904-6908(本明細書中では参考文献に取り入れられている)において開示されている。特に有用な細胞系はJ5581と命名されたマウスミエロマ細胞であり、これは本分野の多くの異なる研究者によって利用されている(パードら、(1986);ブルグマン(Brugeman)ら、(1987);ガスコニエ(Gascoigne)ら、(1987);オア(Oi)ら、(1983)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、80:825-829;トラウネッカー(Trautnacker)ら、(1986)、Eur. J. Immunol.、16:851-854;ツェンら、(1988)、J. Immunol.、141:308-314;ウィリアムら、(1986)、Gene、43:319-324)。この細胞系は免疫グロブリン鎖(ラムダ)鎖を生産するが、重鎖を生産する能力を失っている。

異なる免疫グロブリン配列を持つ発現ベクターとともに、もしくは、あるいは異なる種からの異なるタンパク質のプロモーターおよび/またはリーダー配列とともに使用するのに適した他の細胞系は、通常、本分野に熟達した人にとっては

ロフェノアセチルに特異的な免疫グロブリンモイエティを有しており、本キメラタンパク質の抗原結合部位を結合するであろうアフィニティマトリクスはブルグマンら、(1987)(本明細書中では参考文献として取り入れられている)により記載されたようにして調製することができる。

#### 抗体受容体アノログ

好適な態様においては、本発明の組み換え融合タンパク質は、結合結合部位をもつSCRを基礎とした多数のポリペプチド認識部位を含んでいる。このような結合領域は一般に1マイクロモルあるいはそれ以下のK<sub>d</sub>を持っており、このことは従来の治療手段における利用にとって十分低すぎるものである。ポリペプチドが免疫グロブリン鎖についていれば、本発明の細胞によって産生される抗体分子は少なくとも2つの結合部位を持っている。なぜなら抗体の各鎖はポリペプチド認識部位をコードする改変ベクターからの鎖一つを含んでいるからである。また、本細胞は、それぞれが免疫グロブリン鎖および重鎖をコードし各々の鎖がN末端に付けられた認識ポリペプチドを持つ2つの改変ベクターを含んでもよい。これらのベクターにコードされるポリペプチドは同じ(この場合、抗体は個々の分子に対し4つの結合部位を持つことになる)にすることも異なる(この場合、抗体は2つの異なる鎖の分子に対し各々2つの部位を持つことになる)ようにすることも可能である。

多数の結合結合部位を含む本免疫グロブリン融合タンパク質と同じ認識特性を持つ巨大分子コンストラクトも、本発明により企図される。巨大分子コンストラクトは、可溶性の生化学的に許容し得る巨大分子に付けられた結合結合部位をもつSCRを含む複数のペプチドを含んでいる。

本抗体は循環系に可溶で生化学的に許容し得る巨大分子である。ここで生化学的許容とは、本分野に熟達したものが食餌療法の一環として患者に上記抗体を注射することを認めるであろうという意味である。本抗体は好適には循環系と比較的安定であり、除去に関しては許容し得る血漿半減期を持つ。適した抗体は、血清アルブミン、ヘパリン、または免疫グロブリンなどのタンパク質、ポリエチレングリコールまたはポリオキシエチルポリオールなどのポリマー、あるいは例えばポリエチレングリコールで誘導することにより抗原性を低減するよう改変された

タンパク質を含むが、それだけに制限されるものではない。適した抗体が本分野では知られており、例えば米国特許4,745,180および4,847,325およびその参考文献に記載されている。

抗体結合部位を持つSCRは、巨大分子抗体への化学的結合が使われる場合にSCRペプチドの末端の反応性が要求されなくてもよいことを除けば、免疫グロブリン融合タンパク質に関して上述したものと同一である。

本コンストラクトは多くの手法により調製できる。抗体がタンパク質の場合、抗体につけられた多コピーのポリペプチドを含む融合タンパク質が発見されるように、抗体の発現ベクターに本ポリペプチド配列をコードするDNAを導入する、組み換えDNA法によって本ペプチドをつけることもできる。免疫グロブリンのN末端領域以外の部分に接合されたSCRペプチドは本発明の範囲内にある。本SCRは、CR1誘導体またはC1r、C1s、ファクターB、C2、ファクターH、C4BP、DAF、MCP、C6、C7、IL-2受容体アルファ、ベクター2-グリコプロテイン1およびファクターXを含むタンパク質誘導体を含む他のタンパク質など、特定の性質を持った別のポリペプチドに融合される可能性もある。また、本ポリペプチドは、例えばポリペプチドの末端にポリペプチドと結合配列の配列をコードする発現ベクターからの発現により、独立に発現することができる（例えば、米国特許4,894,443記載）。また、本ポリペプチドは受容体タンパク質のタンパク質分解の切断によって得てもよい。これによりポリペプチドは本発明により企図された個別の構造と抗体結合部位という特性を持ったままとなる。ポリペプチドを独立して得る場合、次にそれを、本分野ではよく知られた化学的結合技術によって抗体である巨大分子に結合させる。

以下の論述を通じて本発明が、記載されている治療において本発明の組み換え融合タンパク質に適用していることから、抗体結合部位を持つSCRを含む複数のポリペプチドを有する巨大分子コンストラクトを企図していることが理解される。

**治療用途**  
CR1またはCR2またはその両方に見られる結合部位に相当する、抗体フラグメントに対する結合部位を有するコンストラクトを調製することができる。CR

1時間であることが望ましい。本コンストラクトが抗ウイルスまたは抗免疫両方に使用される場合は、本コンストラクトの血清半減期は少なくとも約10時間、好適には少なくとも約1日であることが望ましい。半減期は本分野で知られている薬物動力学的ルーチン技術により容易に測定することができる。

本発明のCR1免疫グロブリンキメラは、CR1配列のSCR8から11まで（C3b結合ドメインに相当する）を含む。これが免疫グロブリン重鎖のNH2末端領域に付けられるように構築された。このコンストラクトはC3b結合を介したCR1/pBSCR1cの別の経路の機能性を維持し、キメラの免疫グロブリン部分に特徴的なin vivoでの安定性を保持していた。免疫グロブリンにより与えられるin vivoでの特徴は、このようなコンストラクトをCR1が関与する疾病および障害の治療のための好適な治療分子にする。そのような疾病および障害は、不適当または望まざる抗体活性化の関与する疾病（血液透析障害、超急性同種移植および異種移植拒絶反応、インテロイキン2（IL-2）治療の際のIL-2誘導性毒性、AIDSなどの血液学的悪性疾患など）；感染症（菌病、AIDS、および炭疽症など）；炎症、障害（自己免疫疾患、成人呼吸困難症候群、クローン病、熱中症、火傷および凍傷などに現れるような）；免疫系障害（自己免疫疾患、リウマチ様関節炎、全身性エリテマトーデス、増殖性腎炎、糸球体腎炎、溶血性貧血、および重症筋無力症など）；神経学的障害（多発性硬化症、ギラン・バレー症候群、卒中、片側性顔面痙攣およびパーキンソン病など）；および後遺血再灌流状態（心筋梗塞、脳血管形成、および心筋バypass形成手術における後ポンプ症候群など）を含むがこれだけに限られるものではない。

免疫応答におけるCR2の生物学的役割の知識は、そのポテンシャルがポジティブフィードバックループ（免疫複合体による過剰な抗体活性化がB細胞のさらなる活性化をもたらすように多くの免疫複合体を形成する自己抗体のさらなる生産をもたらす）のために存在していることを示すのに十分である。C3dgを含む複合体に対する細胞受容体と結合する可溶性CR2は、この複合体によるB細胞活性化へのポジティブフィードバックループをブロックできた。

抗体結合部位を有する可溶性コンストラクトは、上記コンストラクトの役目が

2に相当するコンストラクトはC3dgおよびiC3bなどのC3フラグメントに、またはEBVおよびEBV誘導タンパク質gp350/220に結合する。1価のCR2分子は好適な治療薬ではない。C3dgをコードされたgp350/220に対する親和性が極めて低いからである。リガンドに対する親和性は結合係数によって高くなるので、多価CR2分子は好適な治療薬である。下記の実施例2において、抗体を基本とし、C3dgおよびEBVに対する2価受容体を含む2価コンストラクトであるCR2-1gの親和性は1価の受容体に比べそれぞれ4000倍（対C3dg）および10倍（対EBV）高くなっている。

CR1の抗体結合部位はC3b（LHR-BまたはLHR-CのN端SCRの結合部位を使用する）、C4b（LHR-AのN端SCRの結合部位を使用する）あるいはその両方に結合するコンストラクトの基礎を形成することができる。2つの改変発現ベクター（一方は片方の付けられた抗体受容体部位の結合領域を持つ免疫グロブリン重鎖を基本とする融合タンパク質をコードし、もう一方はもう片方の付けられた抗体受容体部位の結合領域を持つ免疫グロブリン重鎖を基本とする融合タンパク質をコードする）が使われる場合、C3bとC4bの両方に結合するコンストラクトを得ることができる。これらの両ベクターの他には抗体を分泌しないミエロマ細胞をトランスフェクトすることによりC3bに対して2つC4bに対して2つの部位を持つ抗体が分泌されるであろう。また、C3bおよびC4b結合部位を含むSCRを免疫グロブリン鎖のN端にタンデムに付け、C3bに対して2つC4bに対して2つの部位を持ちC3bとC4bの両方に結合する抗体を産生することができる。

CR1を基本とした可溶性抗体結合タンパク質が調製されている（フィアロン（Fearing）ら、1989）が、本発明にしたがって調製されるコンストラクトは、本コンストラクトの抗体部分の安定性に基づき哺乳動物の循環系において高い安定性を持つであろう。いくつかの抗体受容体からの部位を含む免疫グロブリン融合タンパク質の半減期は元の免疫グロブリンの半減期（6-8日とされている（ビエイラ（Vieira）ら、（1988）、Eur. J. Immunol. 18:313-316））によるであろう。本コンストラクトの治療用途が抗体活性化の阻害である場合、本コンストラクトの血清半減期は少なくとも約

抗体の活性化および細胞の抗体依存性活性化を阻害するような場合には、抗体依存性細胞活性化に関する多くの疾病状態の治療に使用することもできる。このような疾病状態は、自己免疫免疫複合体疾患（免疫性血小板減少、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、関節炎、自己免疫性溶血、糸球体腎炎、多発性硬化症、天疱瘡、クリオグロブリン血症、およびAIDSなど）、エプштейン・バーウイルス関連疾患（シェグレン（Sjögren）症候群、リウマチ様関節炎、パーキンソン病、ホジキン病、ウイルス（AIDSまたはEBV）関連性B細胞リンパ腫、慢性疲労症候群、リウマチなどの寄生虫および免疫抑制された疾病状態（同種移植片移植後またはAIDSにおけるウイルス感染など）を含むがこれに限定されるものではない。

EBVは、ウイルス感染における重要なステップとしてB細胞上のCR2に結合する。C3dgは抗原と複合体を形成し、B細胞上のCR2受容体と結合して抗体生産を活性化する。好中球およびマクロファージ上のCR3と結合したiC3bにより貪食作用が引き起こされる。炎症の際、iC3bは好中球上のCR3に結合し内皮細胞への接着を促進する。炎症の際、C3bとC4bは細胞に結合したCR1を介して様々なタイプの細胞と結合する。

CR2-1gなどの、CR2を含むコンストラクトはEBVに対して細胞に結合したCR2と結合し、EBVの細胞への結合を減少させEBVの感染を阻害する。このようなコンストラクトはC3dgに対してでも結合し、従ってB細胞の活性化を阻害するであろう。この作用は、リウマチ様関節炎および全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患において特に重要である。iC3bへの結合により、本コンストラクトは好中球およびマクロファージによる貪食作用を阻害することができる。本コンストラクトは炎症を抑えるはたらきをすることもできる。

本発明において、免疫グロブリン重鎖のN端に付けられたCR2のSCR1および2を含むCR2免疫グロブリンキメラが構築された。このキメラ分子はin vivoでT細胞依存性およびT細胞非依存性の両方の免疫応答について免疫応答を示し、C3への受容性を介して免疫応答を高める抗体受容体としてのCR2を同定した。この発見は、in vivoでのB細胞活性化におけるCR2の役割を示唆する多くの研究にたいするin vivoでの相関現象を提供し、



CR2と免疫反応するマウスCR1に対するモノクローナル抗体がマウスにおける抗体反応を阻害したという以前の観察結果を明確にするものである。CR2がCD19/CR2複合体のリガンド結合サブユニットであることが示されたことと相俟って、CR2-1gG1の免疫抑制作用は、CD19/CR2複合体の情報伝達機能が抗原に対するB細胞の「u v l y o」での応答を増加させるという生物学的意義を持つことの最初の証拠を提供するものである。可溶性CR2-1gG1キメラは、抗原に対するB細胞の「u v l y o」での応答を阻害できることから、治療面において不適当あるいは望ましくないB細胞活性化を示す疾病または障害を治療するのに有用なはずである。上に挙げた疾病および障害に加え、このようなキメラは、(例えば、同種移植片移植後の)免疫抑制またはその治療に使用される異種移植片モノクローナル抗体などの免疫抑制剤に対する、望ましくない1次抗体反応を防ぐのに有用なはずである。

CR1配列を基本とする結合領域を持つコンストラクトは、重症筋無力症における血清に阻害した組織膜および望ましくない抗体活性による他の障害を抑えることを含め、可溶性CR1に匹敵する抗体阻害機能を持つであろう。しかし本コンストラクトは可溶性CR1よりも「u v l y o」で長い半減期を持ち、組織の免疫能により広く拡散する能力を好適に持つことである。

抗体を活性化させる寄生物、細菌および病毒(即ち、リーシェマニア、肝虫)はCR3を用いて細胞に入り込み増殖サイクルを開始する。抗体受容体細胞配列を持つコンストラクトは寄生物上の受容体結合部位をマスクし、融合タンパク質のガンマー1鎖のFcドメインを介してその複合体をFc受容体へと送り込むであろう。このようにして寄生物は、CR3媒介性食作用によって肝中体内(ここでは寄生物は動物の防御機構から保護される)に取り込まれるのではなく、Fc受容体媒介性細胞死のバーストにさらされることになる。

種々の抗体依存性現象を阻害するような動物の治療は、本発明により提供される組み換え融合タンパク質またはコンストラクトの投与により達成することができ、抗体以外の標的分子に結合する認識ペプチドを持つ組み換え免疫グロブリン融合タンパク質は、種々の標的分子の細胞への結合による細胞死を阻害するために治療面において利用される。

対する結合サイトは二つのアミノ末端の短い共通配列を返し配列(SCR)に位置している(Lowell, et al., (1980), *J. Exp. Med.*, 159, 1931-1946)。これらSCRはガンマー1鎖をコードするネズミのゲノミック重複DNAの5'末端にクローン化された。得られた融合タンパク質はネズミのミエローム細胞系でうまく発現され、CR2-1gG1と名付けられた。

#### ネズミのゲノミック ガンマー1 DNA へのCR2 のクローニング

Ballard, et al. (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:9626-9630に従ってpSR201と名付けられたネズミ ガンマー1 ゲノミッククローン(参考文献の図表1)はアミノ酸5番目と6番目の間にPstIサイトを含有しており、安定した宿株への組み込みによって、G418耐性を与える。CR2 の最初の二つのSCRを含有しているEcoI-XhoI断片はcDNAクローン(Weis, et al. (1988), *J. Exp. Med.*, 167, 1047-1056)に基づいてから単離された。二つの短いオリゴヌクレオチドは、ガンマー1 DNA のPstIさいとにCR2断片を挿入することが出来るように作成された。5'オリゴヌクレオチドはイムノグロブリンの読み枠を保持するために付加された。3'オリゴヌクレオチドはCR2とVH鎖の間の柔軟な連結のためにヴァリンとセリンをコードしていた(図2の配列参照)。こうして得られたクローン(pSNCR2)はアミノ酸1-5で再び開始するネズミガンマー1鎖をコードする(図1,2,3参照)。

#### エレクトロポレーションと選択

J558L ミエローム細胞系はS.L. Morrison博士の恩恵で提供された。それは92% v/vの存子血清(BCS)を添加したRPMI1640培地("ATCC Catalog of Cell Lines and Hybridomas," 6th Ed., 1988, pp. 353-4)で培養された。

J558L はラムダ軽鎖を含有するJ558(ATCCアクセションナンバー#TIB 5)の重鎖を失った変異株である。pSNCR2 および発現されていないガンマー1 DNA (pSNCR21)はPvuIを用いて置換化された。ミエローム細胞はエレクトロポレーションでトランスフェクションされ、24時間後にG418(1mg/ml)の添加により選択され、マイクロタイタープレートにクローン化される。

得られたクローンは選択され、上清はELISAによって1gG1活性を測定された。

上記の方法において、本化合物は、例えば点滴または巨孔板などの固相基質のいづれによっても投与されることが出来る。種々の服用系が知られており、これらは融合タンパク質およびコンストラクトの服用に使用することができる。これにはリポソームによるカプセル化、顆粒、またはマイクロカプセルが含まれる。他の導入方法には皮下投与、筋内投与、腹腔内投与、静脈投与、皮下投与、鼻腔内投与、および経口投与が含まれるがこれだけに限定されない。

本発明はまた、医薬組成物を提供する。そのような組成物は治療上有効量の融合タンパク質または構築物および、適度上許容される媒体を含んでいる。このような媒体は、生理食塩水、平衡化された生理食塩水、デキストロース、および水を含んでいるがこれらに限定はされない。

典型的には静脈注射による投与用の組成物は、滅菌された等張水性緩衝液に溶解されている。必要であれば、組成物は溶解促進剤および注入部位の痛みをやわらげるためにリグノカインのような局所麻酔剤を含んでもよい。一般に、各成分は単位服用量毎に別々に、または混合されてアンブルまたは少量入りの袋といった密閉した容器に、活性単位で換算した活性のある製剤量を明示して供給される。構築物が注入によって投与される場合は、滅菌した医薬品用の「注射用水」または生理食塩水を含む注入用で溶解することも可能である。構築物が注射によって投与される場合は、注射用緩衝液または生理食塩水のアンブルは、各成分が投与前に混合されるために、提供してもよい。

医薬組成物の一つまたはそれ以上の成分で満たされた、一つまたはそれ以上の容器を含む製剤のバックもまた、本発明の範囲に含まれる。

構築物はタンパク質の重量レベルが約1から100 μg/mlの範囲を維持するように投与されるが、これは融合タンパク質または構築物の特異的結合反応に必要な量に基いている。

以下に示す実施例は説明のためにのみ含まれており、本発明の範囲を限定することは意図しない。

#### 実施例1

ヒトタイプ2抗体受容体(CR2, CD21)は、ヒトC3dおよびサブユニットインバーテールウイルス(EBV)のリガンドである。これら二つのリガンドは

これは、以下のようにして行われた：

ネズミ1gG の断片に対する抗体は組織培養上清中に存在するいかなる1gG1をとらえるようにマイクロタイタープレートのウェルに固定化された。ネズミのイムノグロブリンのラムダ軽鎖に特異的な、ヘルペシスでラベルされた二次抗体は、結合の後、プラスミドと標的のミエローム細胞からのラムダ重鎖由来のガンマー1鎖を含む完全な1gG の存在をシグナルで示す。

#### タンパク質の精製

発現されたタンパク質CR2-1gG1と1gG1は記述された方法にしたがって(Bruce wana, et al. (1987), *J. Exp. Med.*, 165, 1351-1351) HIF-セファロース上のアフィニティークロマトグラフィーによって培養上清から精製された。SDS-PAGEによる解析によって精製されたタンパク質は、軽鎖はそのサイズが等しく、CR2-1gG1キメラの重鎖は1gG1の場合よりも19kDa大きいことが明らかになったが、これはα-グリコシル化され得るふたつのサイトを持つSCRが二つ存在することと、整合性を示していた。図3参照。

#### 実施例2 ヒトC3dの細胞結合したCR2 に対する構築物の結合を分析する結合

K562細胞(ATCCアクセションナンバー#CCL243)はLowell, et al. (1989)に従って調製されたヒトCR2の配列を含む発現ベクターで、リポフェクション(Bio lthada Research Laboratories, Inc.)によってトランスフェクションされた。グルタルアルデヒド重合されたC3dは<sup>125</sup>Iでラベルされた(C3d)-[Cartier, et al., *J. Immunol.*, 143:1755-1760]。細胞は1 μg/mlのpC3dとともに、増大する濃度の1gG1または実施例1のCR2-1gG1の存在下あるいは非存在下で、氷上で30分培養された。等量のジブチルおよびジオニルアレータの混合物中で凍結保存された。沈殿および上清中の放射活性はガンマーカウンタで決定された。

K562細胞に於ける重合C3dのCR2 との相互作用は5nMの濃度の組換え可溶性CR2-1gG1によって50% 阻害される(図4)。可溶性で、切断された形の、膜貫通領域及び細胞内領域を欠いたCR2 に対するC3dの単体の結合は、K<sub>d</sub>が27.5 μMで生じる(Moore, et al., (1989))。従って、キメラタンパク質の二つの鎖の中にある二つのCR2 結合領域はpC3dと相互作用し、2つの結合反応を引き起こし、

アフィニティーを定量的に求める。

#### 細胞結合したEBVタンパク質に対するCR2-IgG1の結合

89S/8 細胞 (ATCCアクセションナンバー #CRL 1612) は40ng/mlのPHA (フェルボール ミリスレート アセテート) が、Bolyanick, et al. (1975) J. Virol., 17:935-949において記述されているように、EBVの発現と分泌を誘導するために、添加されていることを除けば、実施例1で用いられたのと同じ増地で培養された。

IgG1およびCR2-IgG1は $2.57 \times 10^6$ /mg および $2.37 \times 10^6$ /mg という特異的活性<sup>12</sup>でラベルされた (Fraker, et al., (1978) Biochem. Biophys. Res. Comm., 80:849-857)。誘導された89S/8の生育可能な細胞はフィコールバック (Pharacia) 上に集束した。細胞はリガンドと共に氷上で30分間培養され、等量のジブチル-およびジニールアクトレートの混合物中で速心遠心された。は液中および上清中の放射活性はガンマカウンターで決定された。

放射標識されたCR2-IgG1は89S/8細胞で発現しているEBVタンパク質に、0.5nMのアフィニティーで結合した (図5)。これは、単価の結合のKdが3.2nMであったように、CR2のEBVへの2価の相互作用を再び示している (Moore, et al., 1989)。

#### マウスまたはヒト血清で標識された抗体によるCR2-IgG1の取り込み

CR2-IgG1のネズミおよびヒトC3断片との相互作用は<sup>13</sup>で標識されたキメラのゲイモサン抗体への取り込みの測定によって比較された。このゲイモサン抗体は、それぞれマウスまたはヒト血清中で、その他の経路の活性化を許容するIgG2<sup>+</sup>およびIgG2<sup>-</sup>の存在下で、あるいは、相補する活性化を阻害するEDTAの存在下で、標識されたものである。これらの相補する活性化抗体は、主としてC3のC3bおよびiC3b断片で標識されており、iC3bはC3d<sup>+</sup>領域を含む。CR2においてC3d<sup>+</sup>と同じアフィニティーで同じサイトに結合する。

CR2-IgG1は、ヒトおよびマウスC3断片で、それぞれ、キメラはヘテロリガンドに対する方が、ホモログスなリガンドに対するよりも、高いアフィニティーを示す。10.0nM-3.7nM(n=5, 平均 $\pm$ SD) および3.2nM-1.6nM(n=4)のKdで標識されたゲイモサン抗体に結合する。(図10参照。)従って、CR2-IgG1

キメラは細胞内CR2のマウス内の相補活性化複合体の結合に対して結合するため用いることが可能である。

#### 実施例3 EBVインフュージョンの阻害

EBVは実施例2に従って培養された細胞から精製された。EBVは12000e.u.で90分間遠心することによって沈降され、もとの体積の1%に再懸濁され、0.8 $\mu$ m膜フィルターを通じて濾過し、100X EBVとした。対照増殖期にある、5x10<sup>6</sup> Ramos細胞 (ATCCアクセションナンバー #1596) は、10 $\mu$ lの100X EBVおよび様々な濃度のCR2-IgG1または実施例1におけるIgG1コントロールを含む90 $\mu$ lの実施例2の組織培養増地で培養された。37℃で二日間培養後、細胞は洗浄され、顕微鏡スライド上に載せられ、空気乾燥されてメタノールで固定された。それらは、エプシエイン-パーラル核抗原 (EBNA) に対する抗体を含むことが示されている10%のヒト血清と、ヤギ抗ヒト C3-FITC とともに、37℃で30分間連続的に処理され、染められた。(Garber(1980), "Herpesvirus," in Lesnott, et al., eds., Manual of Clinical Microbiology 3rd ed., Am. Soc. Microbiol., Washington, pp. 807-809).

EBVによるRamos細胞のインフュージョンはCR2-IgG1の添加によって、量に依存して、阻害された。0.4 $\mu$ g/mlの濃度では、EBNA発現は、バックグラウンドのレベルにまで低下した。コントロールのIgG1は非添加と同様の作用を示した；どちらの場合も10XのRamos細胞がインフュートされた。

#### 実施例4 PBLによるEBV増殖性・B-チミジンの取り込みの阻害

CR2-IgG1の、PBLsのEBV増殖性増殖に対する阻害能力はT-リンパ球の増殖を阻害するシクロスポリン存在下で評価された。EBVウイルスは実施例2の記述に従って8日間増殖させた培養細胞の上清から精製した。細胞は3500 e.u.で15分間の遠心によって除去された。上清は0.4 $\mu$ mの膜フィルターを通過した後、末梢血白血球(PBL)のインフュージョンに用いられた。末梢リンパ球は末梢血からフィコールバックによって、遠心して単離された。50 $\mu$ l RPMI 1640、20X BCS中の10<sup>6</sup> PBLは、50 $\mu$ lのEBV懸濁液および様々な濃度のCR2-IgG1または実施例1におけるコントロールのIgG1とともに、37℃で一晩培養された。1細胞による干渉を防ぐために、シクロスポリン (2 $\mu$ g/ml) が、RPMI 16

40、10% エタノール、2% Tween80 に溶解された、1ng/ml保存液から添加された (Rickason, et al., Cell Immunol., (1984), vol. 87, pp. 646-658)。

48時間後に1 $\mu$ Ciの<sup>3</sup>H-チミジンが添加された。12時間後に細胞は集められ、取り込まれた放射活性は液体シンチレーションカウンターで測定された。

<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みによって発現したEBVインフュートされたB-リンパ球の阻害物は、CR2-IgG1によって量依存的に阻害され、50 $\mu$ g/mlで完全に阻害される (図6)。

#### 実施例5 CR2-IgG1の、抗原に対する一次反応の抑制能力

抗体依存的な、T依存的またはT非依存的抗体反応に対する抗体反応のネズミのモデルは確立されている (Matsuda, et al., (1978), J. Immunol., 121, 2049および Martineau, et al., (1978) J. Immunol., 121, 2043)。BALB/cマウスはNCI飼育施設から得た。それらは、到着後1週間休まされた。補体の枯渇のために、マウスは20 $\mu$ gのコブラ毒因子(CVF)を腹腔内に、免疫化の前に24時間前に投与して等量ずつ4回注入された。CR2-IgG1およびコントロール (無関係なIgG1) は免疫原である蛍光フィコールとともに、免疫化する時点で投与された。このT非依存的な抗原は、抗体分子につき91分子の蛍光を含んでいる。マウスは少量 (8 $\mu$ g) および多量 (100 $\mu$ g) の蛍光フィコールによって免疫化された。5日目にマウスは殺され、血液サンプルは取り上げられ、脾臓細胞は、PFC分析に用いられ、IgM値およびブランク形成細胞(PFC)反応が決定された (Bislatz, et al., J. Immunol., (1989), vol. 143, pp. 1239-1244)。IgM値は用いられたELISAシステムにおいて測定された $\mu$ OD/minと比例していた。

免疫化と同時に投与された、100 $\mu$ gのCR2-IgG1はIgMレベルを57 $\mu$ OD/minから40に低下させた。CVFは15 $\mu$ OD/minまで大幅に低下した；5日目に決定されたバックグラウンドは15 $\mu$ OD/minであった (図7)。CR2-IgG1で処理したネズミの脾臓におけるPFCの数もまた約50%低下していた；コントロールのIgG1で処理したマウスは10<sup>6</sup>に対して、3500の特異的ブランク、CVFで処理したマウスは1000、CR2-IgG1処理したマウスは2200となった。

CVFはコブラ毒から得られたタンパク質で、C3に対するコンペルターゼの活性を持つ。この酵素は注入されたマウスの活性のあるC3を枯渇させ、したがって、

少量の免疫原に対する免疫反応を低下させる。CVFはこれらの実験に於てポジティブコントロールとして用いられている。CR2-IgG1融合タンパク質は産生された特異的IgMのレベルを低下させ、8 $\mu$ gの蛍光フィコールによって免疫化された後の脾臓当りのPFCの数をCVFと比較して50%まで低下させる。100 $\mu$ gの蛍光フィコールに対する反応はCVFで阻害されるほど顕著には低下しない (Martineau, et al., (1978), J. Immunol., 9, 2052-2055)。

CR2-IgG1は細胞内CR2と、C3d<sup>+</sup>にたいして、効果的に結合するが、これはおそらく、抗体-抗原複合体を生じさせ、ここに免疫化の間に結合し、したがって、B細胞に対するCR2の共に阻害する役割を減少させるのであろう。CR2-IgG1はB細胞の活性化をin vivoで抑えることが出来るため、扱いにくい抗原特異的B細胞活性化を含む病状においても臨床的に有用であろう。

CR2-IgG1構築物の、T-依存的抗原、ヒツジ赤血球に対するマウスの反応における効果もまた、測定された。3つのグループのBALB/cマウスはヒツジ赤血球に対する免疫反応を評価された (B)；最初のグループのマウスは全量800 $\mu$ gとなる組織浸透性IgG1を4回に分けて、免疫化0時間に静脈内に。そして、免疫化0.5時間、3時間、および17時間後に腹腔内にそれぞれ、4x10<sup>6</sup>および4x10<sup>8</sup>と与えられた；2番目のグループのマウスにはIgG1の代わりにCR2-IgG1が与えられた；そして、3番目のグループのマウスは免疫化に先立って24時間の間にコブラ毒因子処理によってC3を枯渇させられた。4番目のグループのマウスにはPBSのみが与えられ、ヒツジEによる免疫化はされなかった。

CR2-IgG1およびIgG1の注入の方法はCR2-IgG1の最初の半減期を記述する基本的な代替の研究の後に明示された。免疫化の後、5日目にマウスはヒツジEに特異的な脾臓直接のブランク形成細胞(PFC)の数と、抗-E IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b およびIgG3の血清レベルを評価された。組織浸透性IgG1を与えられたコントロールのマウスはヒツジEに対して、量に比例して反応し、脾臓PFCの数と、IgG1を除いた計測した全てのアイソタイプの前で特異的抗体の血清濃度が増加した (図11)。

既に報告されているように、特異的抗体反応はマウスC3の枯渇によって消滅するが、このことは、この実験で用いられている抗原の濃度では、B細胞の反応は

特表平5-507197 (10)

この補体タンパク質の活性化に依存していることを示唆している。CR2-IgG1を与えられたマウスはC3-消費マウスと同様に免疫抑制されており、このことは、脾臓内のCR2はこのT細胞依存性B細胞反応の補体依存性を調節していること、そして、CR2-IgG1はT細胞依存性抗原に対する抗体反応の効果的な抑制剤であることを意味している。

#### CR2-IgG1構築物のアイソタイプスイッチの阻害

さらに、CR2-IgG1キメラの、IgM以外のアイソタイプのうちで抗-抗原の発現に対する効果を検討するために、マウスは $4 \times 10^5$ の免疫化後3から5週間に渡って評価された。二つのグループのBALB/cマウスは、全量800  $\mu$ gとなるIgG1およびCR2-IgG1をそれぞれ、等量となるように5回に分けて、免疫前1時間に腹腔内に、免疫化と同時に脾臓内に、そして、免疫化0.5時間、3時間、および17時間後に腹腔内に投与された。3番目のグループはPBSを投与され、Eによる免疫化は受けなかった。CR2-IgG1は抗E12Hを5日目に完全に抑制し、それ以後はこの特異性を有するIgMはいかなるグループに於いても検出できなかった(図12)。後期に脾臓をもち、IgG1処理されたマウスでは40日にならないうちに持続する。様々なアイソタイプの中で、抗Eの出現もまた、CR2-IgG1で処理されたマウスでは50%から70%減少していた。従って、可溶性CR2は、一次反応およびそれに続く、T細胞依存性抗原、ヒツジEへのアイソタイプスイッチングを阻害する。この実験は、組換えタンパク質中に混入している可能性のあるリボポリサッカライド(LPS)の影響を除去するためにLPS新性である、C3H/HeJ株でもおこなわれたが、0.16mg/mgタンパク質以上の濃度に於いて行なわれた。Lisules 上清分析に於いて、何も検出されなかった。CR2-IgG1は、BALB/cマウスの場合と同様、C3H/HeJマウスに於いて、ヒツジEに対するIgMおよびIgG1反応を抑制する働きを見せた(図11)。このことはCR2-IgG1分子が、抗原に対する1次B細胞応答を阻害する、IgEおよびIgG1における効果的な免疫抑制剤であることを示している。

#### 変換例6 阻害されたCR2構築物の半減期の測定

組換えIgG1、CR2-IgG1およびCR2-F(ab')<sub>2</sub>は<sup>125</sup>Iで標識され、マウスに注入された。様々な時間に血液は採取され、放射活性が測定された。標識された種類の濃度は既知の放射活性を用いて計算された。得られた結果は図13に示

されている。減衰は各標に対して、2相的であった。CR2-IgG1の半減期は最初15分よりも短かったが、10から20時間にかけてはそれらの半減期は類似していた。CR2-F(ab')<sub>2</sub>はIgG1またはCR2-IgG1の両方の場合よりも明らかに早く減衰した。従って、CR2のSCRsの125Iの各重鎖への融合はイムノグロブリンのIgEおよびIgG1における特徴的な安定性の大部分を維持している分子を産生していることになる。

#### 変換例7 CR2-F(ab')<sub>2</sub>構築物は補体結合を阻害する

CR1は39のSCRs(短い共通繰り返し配列)をF-プロタイプ中に含んでいる。SCRsは最初の28のうち、7つのSCRsの4グループとなるように並べられている。これらのグループのうちのひとつ(長い共通繰り返し構造)はC3bの結合サイトをもち、ふたつはC3bに対する結合サイトを持っている。8-11と番号が打たれたSCRs(C3b結合活性があると予想されている)は本発明に従った、組換えDNA技術によってイムノグロブリン重鎖F(ab')<sub>2</sub>に付着している。CR1のSCRs8-11に対応する配列は末端のPstI制限配列を含む特異的プライマーを用いて、CR1の全長DNAクローンの重合連反応増幅によって産生された。(27マアの5'プライマー配列は5'-GACCTGACGTTGGACCTGCTCACCTG-3'、42マアの3'プライマー配列は5'-GACCTGACGTTGGACCTGCTCACCTG-3')増幅されたDNAはPstIで切断され、得られたCR1断片はF(ab')<sub>2</sub>ベクター(Neshorster et al., 1984, Nature 312:604-608)のPstIサイトにクローニングされた。ハイブリッドのCR1-F(ab')<sub>2</sub>は、組換えプラスミドをJ558L細胞にトランスフェクトし、得られた細胞をBPH1媒体に0.418と10% (ウシ血清を加えた増地内で培養することによって、タンパク質として発現される。タンパク質の発現はNIP 細胞ELISA分析によって決定される。発現されたCR1-F(ab')<sub>2</sub>はNIP-セファロースアフィニティークロマトグラフィーによって精製され、PBS中で透析され、-100℃で保存される。得られたタンパク質は、ヒト赤血球に対するC3bの結合に対する阻害能に関して評価される(図)。比較するために、可溶性CR1(sCR1)を用いて同様の阻害実験が行なわれた。

C3b 2量体は<sup>125</sup>Iによって放射性標識され、ヒト赤血球とともに培養される。様々な量のsCR1/pBSCR1cまたはF(ab')<sub>2</sub>-CR1が添加され、赤血球に結合した、<sup>125</sup>I-C3bの量が決定される。図14に示したように、sCR1/pBSCR1cおよび

F(ab')<sub>2</sub>-CR1の両方がC3b 2量体の結合を同様に阻害する。このことは、SCRs 8-11はCR1の完全なC3b結合領域を含んでいることを示している。従って、30 SCRsを持つsCR1/pBSCR1cの完全な2倍のC3b結合機能は、これらSCRsのたった4つを、各F(ab')<sub>2</sub>構築物の重鎖に付加するだけで、理解可能である。

#### 変換例8 CR1-F(ab')<sub>2</sub>構築物は古典的経路の活性化を阻害しない

抗体感受性ヒツジ赤血球(EA)はヒト補体の古典的経路の活性化によって溶解される。ヒトCR1の可溶性断片は、結合し、ヒト補体のC4bおよびC3bを不活性化することによって、この溶解を阻害する。sCR1/pBSCR1cおよびF(ab')<sub>2</sub>-CR1が、この溶解を阻害する能力が解析された。図15に示したように、sCR1/pBSCR1cは、この溶解をほとんど完全に阻害する。F(ab')<sub>2</sub>-CR1 (SCRs 8-11のみを含む)は、かなり低い程度に阻害する。おそらく、これは、構築物中にC4b結合サイトが欠落しているためであろうと考えられる。C4b結合機能およびC4b不活性化機能をCR1-F(ab')<sub>2</sub>に与えるようなSCRsの付加によって、同様の古典的経路阻害機能が供与されることが期待される。

#### 変換例9 CR1-F(ab')<sub>2</sub>構築物は補体の代替経路を阻害する

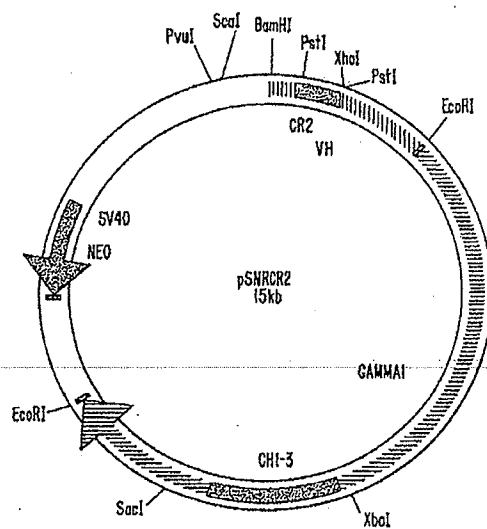
ゼイモサンは樹根の菌根菌の担子菌であるが、ヒト血清中の代替経路を活性化させる。活性化は、C3aまたはC5aに対する放射免疫分析(RIA)によって測定することが可能である。sCR1/pBSCR1cはこの活性化を阻害することが知られている。

F(ab')<sub>2</sub>-CR1構築物による、ゼイモサンによる代替経路の活性化の阻害は、測定され、sCR1/pBSCR1cの場合と比較された。図16及び17に示したように、F(ab')<sub>2</sub>-CR1はsCR1/pBSCR1cと同様にC5aの形成を阻害し、sCR1/pBSCR1cとは同様にC3aを阻害する。

これらの結果は、sCR1/pBSCR1cの代替経路阻害機能の全てはSCRs 8-11のみをF(ab')<sub>2</sub>構築物中の各重鎖に転移することによって再現されることを示唆している。

これらの研究は、また、これらのSCRsが代替経路阻害の全機能に充分であって、C4b結合機能およびC4b不活性化機能を有するCR1の最初の長い共通繰り返し配列のSCRsの付加は、古典的経路阻害機能に必要であることを示唆している。

FIG. 1



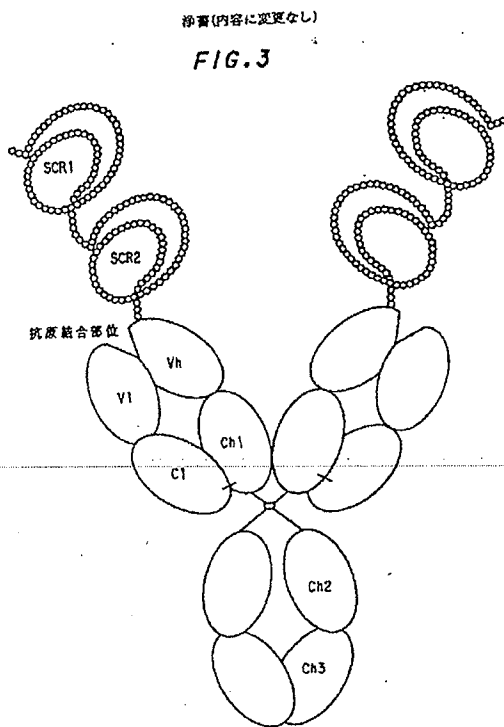


FIG. 4

3x10<sup>6</sup> K562-CR2 + 1μg/mL PC3d9 125I

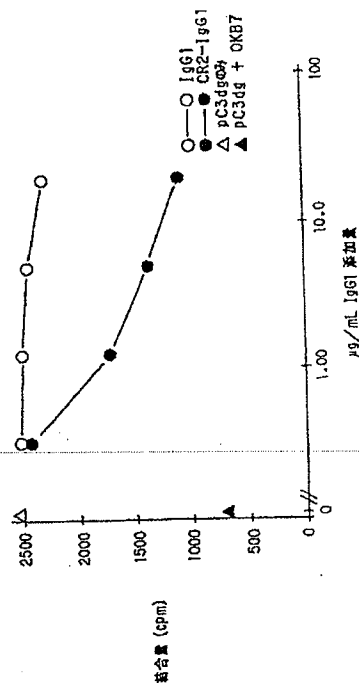


FIG. 2A

90 100 110 120 130 140  
AAATCCTGTGTCTACAGTGGTAAATATAGGTTGTCTACAGGATACAAAAACATGAG  
..] 70E-9-

150 160 170 180 190 200  
ATCACTGTTCTCTTTACAGTTACTGACACACAGGACCTCACCATGGATGGAGCTGTAT  
M 6 W S C I  
-19.....196 9-9-

210 220 230 240 250 260  
CATGCTCTTCTTGGCAGCAACAGCTACAGGTAAGGGGCTCAGAGTAGCAGGCTTGAGGIC  
M L F L A A T A T  
アジフ.....-5

270 280 290 300 310 320  
TGGACATATACATGGGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACT  
G V H  
-4

FIG. 2B

330 /PstI  
CCAGGTCCAACTGCAGCTCGGGAATTTCTTGT.....  
S Q V Q L Q L G I S C .....

1 <--- IgG CR2 ----->

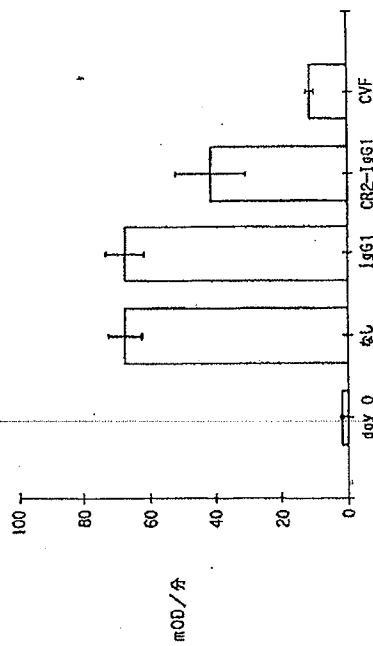
.....CR2の約400ヌクレオチド部分.....

.....CTCTCCAGGTGAGCAGGTCCTCAACTGCAGCAGCCTTGGGCT /PstI  
..... P L E V S Q V Q L Q Q P G A  
..... <---CR2 ヒンジ部 1 2 3 4 5 IgG ----->

特許(内容に変更なし)

FIG. 7

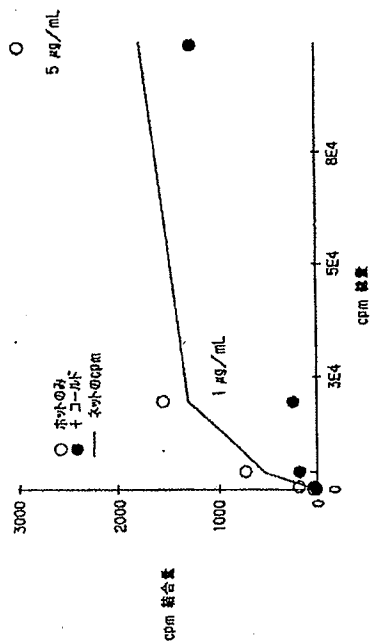
45における8 $\mu$ gFLUに対するIgM抗体



特許(内容に変更なし)

FIG. 5

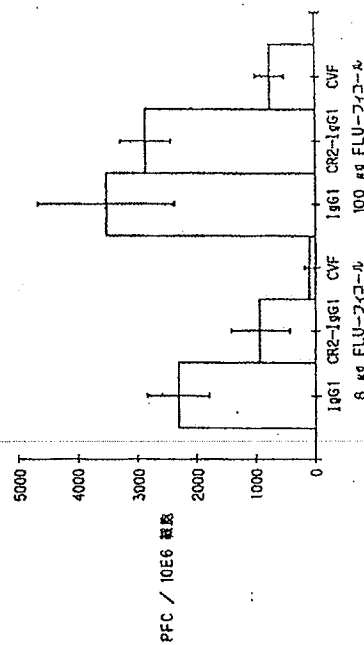
4x10<sup>5</sup> B95/8 + CR2-IgG1



特許(内容に変更なし)

FIG. 8

BALB/c + 8 or 100  $\mu$ g FLU-フィコール



特許(内容に変更なし)

FIG. 6

PBL + EBV + / - CR2

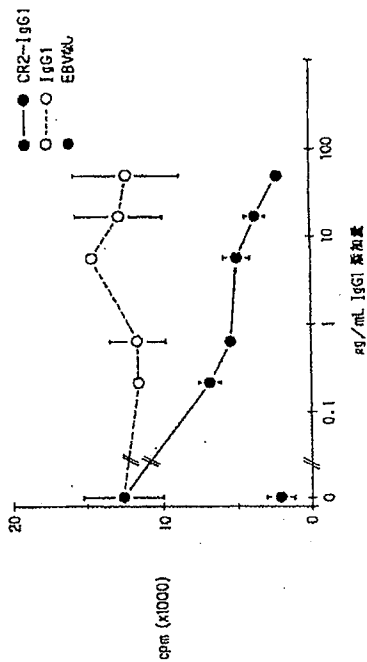


FIG. 9



FIG. 10A

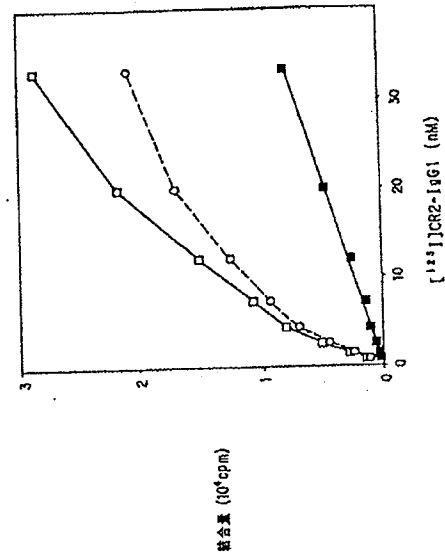


FIG. 10B

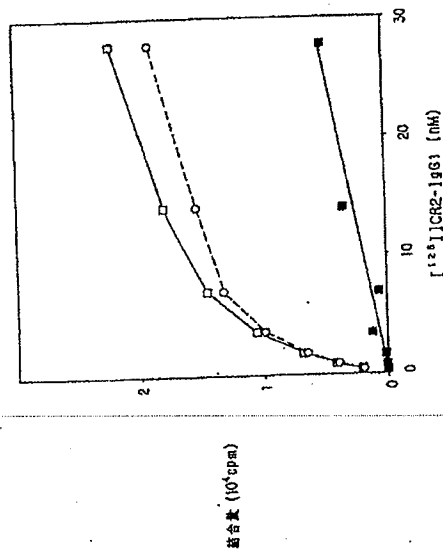


FIG. 11A

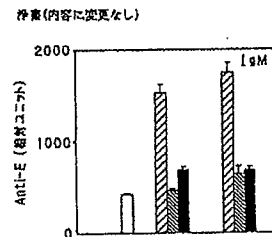


FIG. 11B

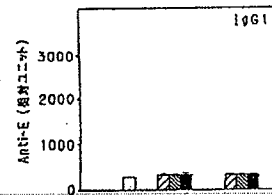
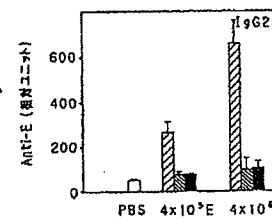
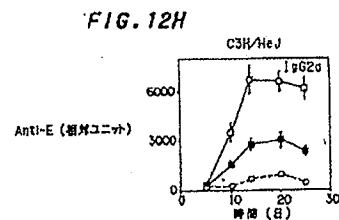
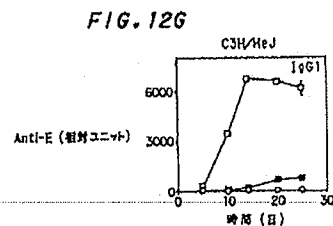
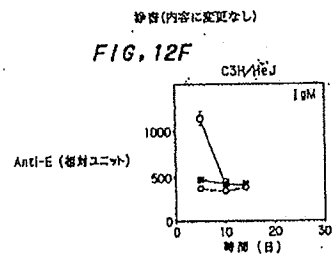
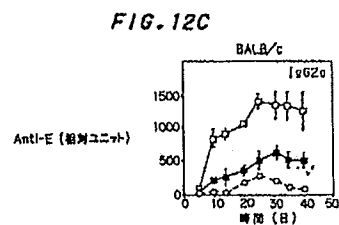
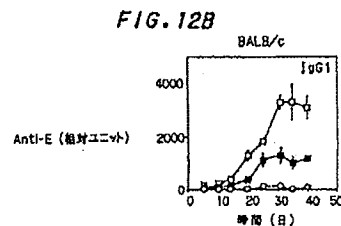
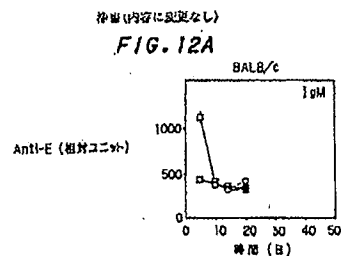
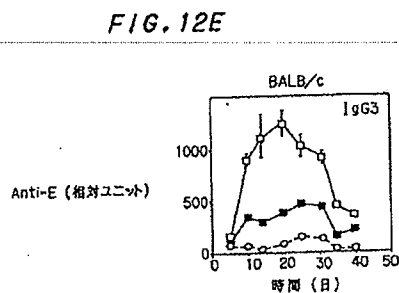
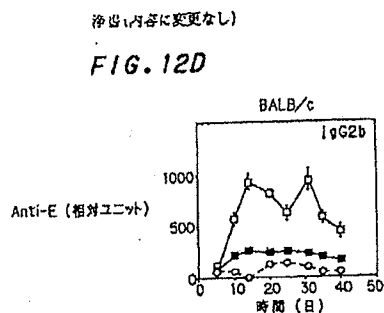
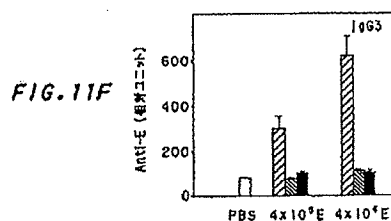
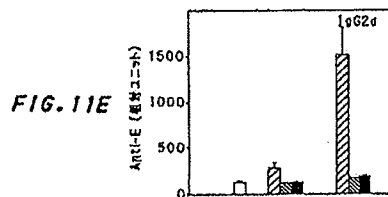
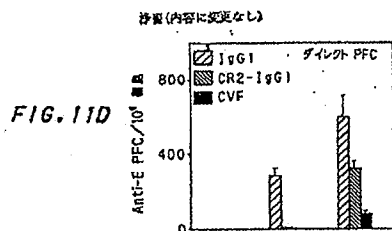


FIG. 11C





浄化(内容に変更なし)

FIG. 12I

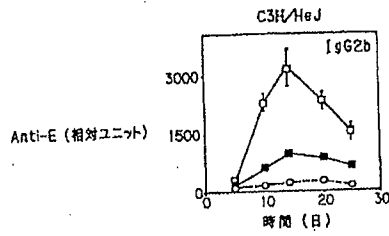
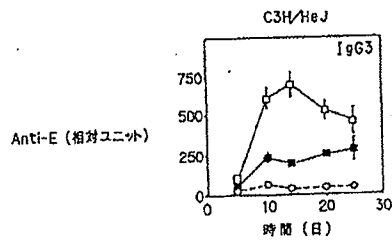
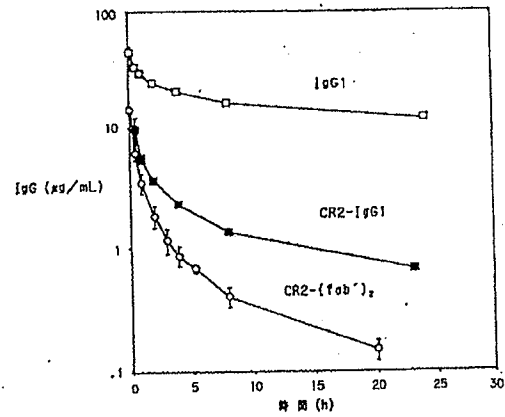


FIG. 12J



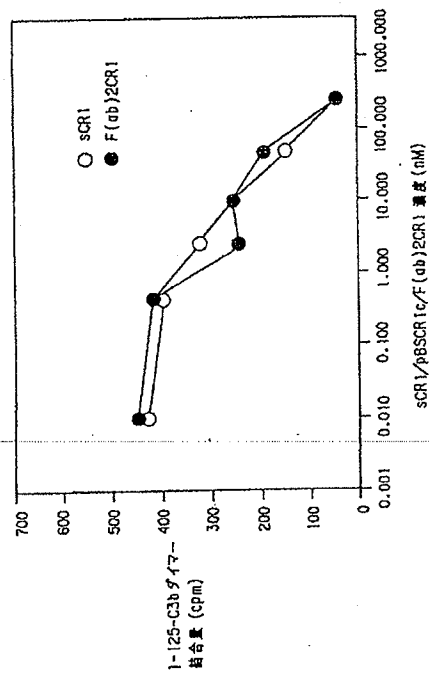
浄化(内容に変更なし)

FIG. 13



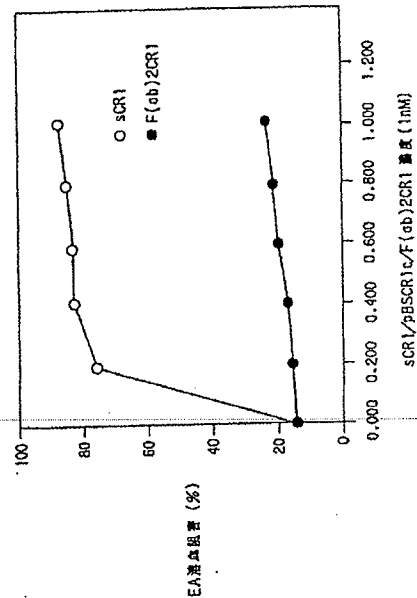
浄化(内容に変更なし)

FIG. 14



浄化(内容に変更なし)

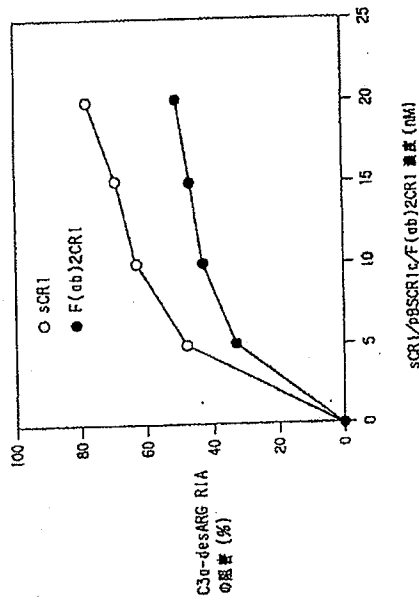
FIG. 15





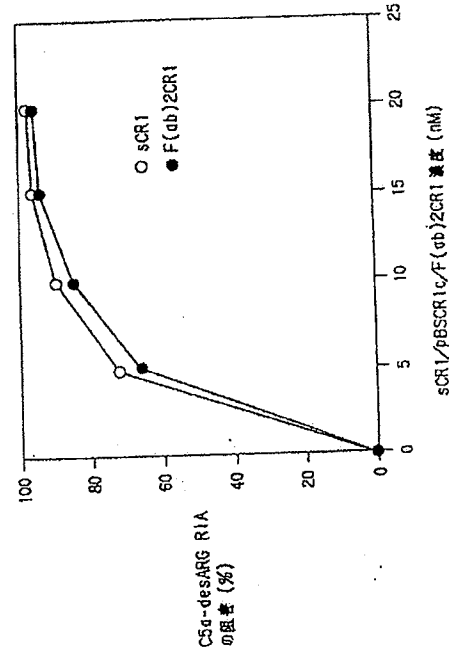
特表(内容に変更なし)

FIG. 16



特表(内容に変更なし)

FIG. 17

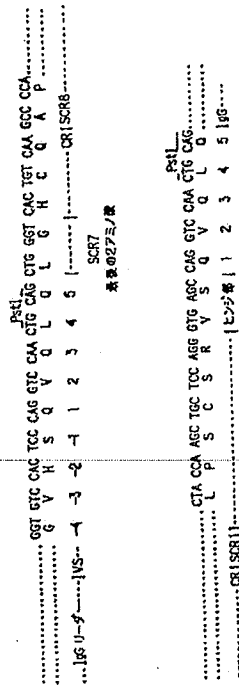


要約書

本発明は、哺乳動物の胎盤系において安定で、補体受容体部位などの標的分子に対する認識部位を含み免疫グロブリン鎖のN末端に繋げられたポリペプチドを含む、可溶性親み誘え融合タンパク質を目指すものである。本発明は、生理学的に適合可能な可溶性巨大分子担体に付けられた、補体結合部位を持つ短い共通鎖り返し配列を含む複数のペプチドを含む複合体も目指している。本発明は、哺乳動物において補体活性化または補体依存性細胞活性化を阻止するために特に有用である。

特表(内容に変更なし)

FIG. 18



平成 5年 6月 4日

特許庁長官      麻 生      渡 邊

## 1. 事件の表示

PCT/US91/02852  
平成3年特許願第509396号

## 2. 発明の名称

結合部位を含む可溶性ペプチド類縁体

### 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所

名 称 ザ・ジョーンズ・ホプキンス・ユニバーシティ

#### 4. 代理人

住所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号  
新大手町ビル 206区  
電話 3270-6641~6  
氏名 (2770) 弁護士 湯 淺 恭 三

## 5. 補正の対象

- (1) 出願人の代表者名を記載した国内寄附
- (2) 委任状及び翻訳文
- (3) 図面翻訳文

## 6. 補正の内容

別紙の通り（尚、上記(3)の書面の内容には変更なし）

10 特許庁  
56. -7  
国出願

特表平5-507197 (17)

國際調查報告

International Application No. PCT/US 91/02852

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER 1.1. International Patent Classification (IPC) of the International Bureau and IPC Int. Cl. 5 C 12 M 15/02 C 07 K 13/00 C 12 P 21/02 A 61 K 37/02 A 61 K 39/395 C 12 N 5/10		
2. FIELD OF SEARCH Molecular Determination Standard		
Classification System	Classification System	
Int. Cl. 5	C 12 N	C 07 K
Determination Standard order that follows the Determination in the General that such Determination are listed in the Field Standard		
3. DISCUSSION OF THE RELEVANCE OF THE CLAIMS		
Category	Character of Determination, 11 with technical, every agreement of the relevant patenting 11	Reference to Other Ref.
Y	EP, A, 0325262 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 26 July 1989, see the whole document ---	1-3
Y	WO, A, 0899220 (THE JOHN HOPKINS UNIVERSITY) 5 October 1989, see page 25, lines 13-14; page 26; page 27, lines 1-14; page 36, lines 10-23; page 47, lines 23-37; page 48-61; page 52, lines 1-14; claims	1-3
Y	NATURE, volume 399, 1 June 1989, W.K. Ghoshdary et al.: "A recombinant immunotoxin consisting of two antibody variable domains fused to pseudomonas exotoxin", pages 394-399, see the whole document ---	1-3
4. SUMMARY OF THE INVENTION		
4.1. Summary of the Invention		
4.2. Summary of the Invention		
4.3. Summary of the Invention		
4.4. Summary of the Invention		
4.5. Summary of the Invention		
4.6. Summary of the Invention		
4.7. Summary of the Invention		
4.8. Summary of the Invention		
4.9. Summary of the Invention		
4.10. Summary of the Invention		
4.11. Summary of the Invention		
4.12. Summary of the Invention		
4.13. Summary of the Invention		
4.14. Summary of the Invention		
4.15. Summary of the Invention		
4.16. Summary of the Invention		
4.17. Summary of the Invention		
4.18. Summary of the Invention		
4.19. Summary of the Invention		
4.20. Summary of the Invention		
4.21. Summary of the Invention		
4.22. Summary of the Invention		
4.23. Summary of the Invention		
4.24. Summary of the Invention		
4.25. Summary of the Invention		
4.26. Summary of the Invention		
4.27. Summary of the Invention		
4.28. Summary of the Invention		
4.29. Summary of the Invention		
4.30. Summary of the Invention		
4.31. Summary of the Invention		
4.32. Summary of the Invention		
4.33. Summary of the Invention		
4.34. Summary of the Invention		
4.35. Summary of the Invention		
4.36. Summary of the Invention		
4.37. Summary of the Invention		
4.38. Summary of the Invention		
4.39. Summary of the Invention		
4.40. Summary of the Invention		
4.41. Summary of the Invention		
4.42. Summary of the Invention		
4.43. Summary of the Invention		
4.44. Summary of the Invention		
4.45. Summary of the Invention		
4.46. Summary of the Invention		
4.47. Summary of the Invention		
4.48. Summary of the Invention		
4.49. Summary of the Invention		
4.50. Summary of the Invention		
4.51. Summary of the Invention		
4.52. Summary of the Invention		
4.53. Summary of the Invention		
4.54. Summary of the Invention		
4.55. Summary of the Invention		
4.56. Summary of the Invention		
4.57. Summary of the Invention		
4.58. Summary of the Invention		
4.59. Summary of the Invention		
4.60. Summary of the Invention		
4.61. Summary of the Invention		
4.62. Summary of the Invention		
4.63. Summary of the Invention		
4.64. Summary of the Invention		
4.65. Summary of the Invention		
4.66. Summary of the Invention		
4.67. Summary of the Invention		
4.68. Summary of the Invention		
4.69. Summary of the Invention		
4.70. Summary of the Invention		
4.71. Summary of the Invention		
4.72. Summary of the Invention		
4.73. Summary of the Invention		
4.74. Summary of the Invention		
4.75. Summary of the Invention		
4.76. Summary of the Invention		
4.77. Summary of the Invention		
4.78. Summary of the Invention		
4.79. Summary of the Invention		
4.80. Summary of the Invention		
4.81. Summary of the Invention		
4.82. Summary of the Invention		
4.83. Summary of the Invention		
4.84. Summary of the Invention		
4.85. Summary of the Invention		
4.86. Summary of the Invention		
4.87. Summary of the Invention		
4.88. Summary of the Invention		
4.89. Summary of the Invention		
4.90. Summary of the Invention		
4.91. Summary of the Invention		
4.92. Summary of the Invention		
4.93. Summary of the Invention		
4.94. Summary of the Invention		
4.95. Summary of the Invention		
4.96. Summary of the Invention		
4.97. Summary of the Invention		
4.98. Summary of the Invention		
4.99. Summary of the Invention		
4.100. Summary of the Invention		

International Association for PCV/US 91702862

11. DOCUMENTS CONTAINED TO BE RELEASED (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)			PL 117-601 337-00000
Category 1	Category of Document, with category, where appropriate, of the document passage	Referent to Class No.	
Y	The Journal of Immunology, volume 135, no. 4, October 1985, The American Association of Immunologists (US) L.F. Fries et al.: "Factor I co-factor activity of CRI overcomes the protective effect of IgG on covalently bound C3b residues", pages 2673-2679, see the whole document -----	J-3	
K	WO, A, 9004176 (SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION, USA) 19 April 1990, see page 9, lines 11-35; pages 10-16; page 17, lines 1-9 -----	I-3	
A	Trends in Biotechnology, volume 6, no. 2, February 1986, Elsevier Publications (Ambridge, GB) B. Williams: "Novel antibody reagents: production and potential", pages 35-42, see page 38, column 3, last paragraph; page 39, paragraph 1-3; figure 3 -----		
P, X	The FASEB Journal, volume 4, no. 7, 26 April 1990, T. Hebell et al.: "CH2-IgG chimera: A dimeric soluble receptor that binds CD39 and EBV and inhibits the immune response to T independent antigens", page A1882, abstract 1102, see the abstract -----	1-19, 21	

From: 603.834.0188 www.cdnlib.org

International Application No. PCT/US91/02857

<p><b>FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET</b></p>		
<p><b>V <input checked="" type="checkbox"/> OBSERVATION WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE 1</b></p> <p>This examination report covers the two types of observations in regard to claims under Article 100(2)(a) for the following reasons:</p>		
<p>1 <input checked="" type="checkbox"/> <b>Claims themselves</b>  <b>completely lacking</b>  <b>see PCT-Rule 39.1(i)(v)</b></p>	<p>because they relate to subject matter not rendered to be searched by me</p>	<p>02.21.84</p>
<p>2 <input type="checkbox"/> <b>Claims themselves</b>          with the prescribed requirements as such an object that no successful international search can be carried out, substantially</p>		
<p>3 <input type="checkbox"/> <b>Claims themselves</b>          because they are dependent of prior art and are not included in observation with</p>		
<p>4 <input type="checkbox"/> <b>Claims themselves</b>          the national or third observances of PCT Rule 6 (1d)</p>		
<p><b>VI <input checked="" type="checkbox"/> OBSERVATION 1 WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING 2</b></p> <p>The International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:</p>		
<p>1 <input type="checkbox"/> All my requested additional search fees have already been by the applicant. My international search report covers all independently claimable inventions in the international application</p>		
<p>2 <input type="checkbox"/> For any series of the requested additional search fees have already been by the applicant. My international search report covers only those inventions of the international application for which I have paid part, totality or all of them</p>		
<p>3 <input type="checkbox"/> My requested additional search fees were already paid by the applicant. Consequently, my international search report is restricted to the inventions that concerned in the claims which I have paid for</p>		
<p>4 <input type="checkbox"/> All my claimable claims should be searched without effecting any additional fee, the International Searching Authority did not modify the scope of any claimable claim</p>		
<p>5 <input type="checkbox"/> The additional search fees were not requested by the applicant</p>		
<p>6 <input type="checkbox"/> The national proceedings are ongoing or additional, or single fees</p>		

Form ECT/ISA/110 HUMANITARIAN SITUATION - 994125 03/11

国際調査報告

US 9102852  
SA 47632

This document contains the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international patent report. The documents are not intended to be the European Patent Office (EPO) file on 15/09/91. The European Patent Office is in no way liable for their particularity which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
EP-A- 0325262	26-07-89	AU-A- 3281869 JP-T- 3502283 WO-A- 6905690	11-08-89 30-05-91 27-07-89
WO-A- 8909220	05-10-89	AU-A- 3539489 EP-A- 0411031	16-10-89 06-02-91
WO-A- 9004176	13-04-90	AU-A- 4243199 EP-A- 0436626	01-05-90 17-07-91

For more details about this report see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/91

第1頁の続き

⑥Int. Cl. \*

A 61 K 37/02  
39/395

識別記号

AB J Y  
AAA Y  
ABA Y  
ABE Y  
ACB Y

庁内整理番号

8314-4C  
9284-4C  
9284-4C  
9284-4C  
9284-4C  
7731-4H

C 07 K 15/12  
C 12 N 5/10

15/62  
15/85

// C 12 N 15/13

C 12 P 21/08

(C 12 P 21/02

C 12 R 1:91)

8214-4B

⑦発明者 ヘベル, トーマス

ドイツ連邦共和国デー2000, ハンブルグ 65, エメクスヴェーク